

Biodegradação de petróleo por isolados de rizóbios provenientes de solos amazônicos.

Brito L.L.¹, Menezes N.C.², Minelli-Oliveira C.¹, Oliveira L.A.³

¹ PG Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas –, ² Mestre em Agricultura no Trópico Úmido, INPA, ³ Pesquisador, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Emails: luci_brito@hotmail.com, naramenezes19@hotmail.com, cassyminelli@gmail.com, luizoli@inpa.gov.br

Resumo

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e outros compostos. A contaminação ambiental por estas substâncias causa grande impacto ecológico. Para a descontaminação dos locais contaminados, a biorremediação utiliza micro-organismos, o que requer mecanismos para estimular e desenvolver a atividade microbiana na degradação de compostos de petróleo. Esse trabalho teve como objetivo, testar isolados de rizóbios na degradação de compostos do petróleo. Foi utilizado o método de riscagem em placas de Petri, tendo o petróleo como fonte de carbono. Dos 120 rizóbios, 93 mostraram capacidade de usar o petróleo como fonte de carbono, apresentando bom crescimento até os 15 dias de avaliação. Desses, 36 mostraram elevada habilidade de degradar o petróleo com seis dias de crescimento. Os melhores apresentaram crescimentos elevados após 24 horas usando o petróleo (INPA R629, INPA R634, INPA R656, INPA R664, INPA R667, INPA R672 e INPA R674). Esses resultados demonstram que os rizóbios podem tornar-se uma alternativa viável e segura para a biorremediação de solos contaminados com petróleo.

Palavras-chave: Metabolismo microbiano, Ecologia microbiana, Biotecnologia, Amazônia

Introdução

A Biorremediação é um processo de simples manutenção, aplicável em grandes áreas e de baixo custo, que usa micro-organismos ou suas enzimas para destoxificar contaminantes no solo ou outros ambientes. É a transformação do contaminante em formas

que não oferecem riscos ambientais (Duarte, 2012). Os acidentes e vazamentos com produtos oleosos, principalmente derivados de petróleo, afetam vários meios ambientes, tanto aquáticos como nos solos. Para a remediação destas áreas, vários processos podem ser utilizados, mas os biológicos são os mais usados devido ao custo e à eficiência, quando comparados a processos físico-químicos (Reginatto *et al.*, 2011). A legislação brasileira exige que áreas contaminadas sejam remediadas para minimizar a interferência ambiental e restaurar os ecossistemas. Para isto, são necessários o diagnóstico, a análise e o monitoramento do impacto e medidas remediadoras (CETESB, 2010). Os micro-organismos são considerados biodegradadores eficientes por sua abundância, diversidade, versatilidade catabólica e anabólica, e capacidade de adaptação a condições ambientais adversas (Moraes e Tornisielo, 2009). Para que ocorra a degradação biológica de compostos orgânicos, como os derivados do petróleo, precisam ser estabelecidas condições ambientais favoráveis (concentração de nutrientes, umidade, pH, temperatura e aeração), além do conhecimento sobre a concentração e o tipo de óleo contaminante, a densidade populacional e o potencial de degradação dos micro-organismos. Os rizóbios fazem parte da população microbiana do solo e seu estudo pode conduzir à descoberta de estirpes para uso na biorremediação de ambientes contaminados com compostos de petróleo, visto que são adaptadas ao ambiente local, e podem mostrar maior eficiência e tolerância às condições de estresse. Portanto, este trabalho testou a capacidade de isolados de rizóbios em degradar petróleo para serem utilizados no processo de biorremediação de solos contaminados com petróleo.

Material e métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Micro-organismos da Amazônia (LEBMAM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), utilizando-se 120 isolados de rizóbios adquiridos através da coleta de nódulos de leguminosas, seguidos de isolamento e purificação, segundo método descrito por Somasegaran e Hoben (1985). As bactérias isoladas foram enumeradas como INPA R546 a INPA R677. Para avaliar a capacidade de degradação de petróleo e seus derivados e o crescimento bacteriano, foi utilizado um método de riscagem proposto por Oliveira e Magalhães (1999) modificado, realizado em placas de Petri contendo meio de cultura YMA (yeast manitol agar), onde foram utilizados 0,1 mL de petróleo como fonte de carbono ao invés de manitol. Como controle foi usado o manitol ao invés do petróleo. Esse

teste foi realizado em quatro repetições. As avaliações foram feitas a cada três dias, por um período de 15 dias, no qual as bactérias foram mantidas em laboratório a uma temperatura de 23 – 28 °C. De acordo com o desenvolvimento das colônias nas quatro zonas da placa, foram dados valores para o crescimento para cada isolado, segundo Oliveira e Magalhães (1999). Com base no crescimento em placas de Petri, os isolados foram classificados como pouco (1,00 à 2,00), moderado (2,06 à 3,00) ou elevado crescimento (3,06 à 4,00) usando o petróleo como fonte de carbono (biodegradação). Para fins de seleção, foram escolhidos os isolados que apresentaram nota mínima de 3,06 ao sexto dia de teste.

Resultados

A figura 1 mostra o crescimento dos 120 isolados de rizóbios com as fontes de carbono manitol (M) e petróleo (P) no período de 15 dias de avaliação. Não houve diferença entre as duas fontes de carbono quando se analisa os percentuais (68% e 69%) para os isolados que apresentaram crescimentos elevados no meio com manitol e petróleo respectivamente. As diferenças dos usos dessas duas fontes de carbono apareceram entre os isolados que apresentaram pouco ou moderado crescimento. No meio com manitol, 11% mostraram crescimento moderado e 21%, baixo crescimento, enquanto que no meio com petróleo, esses percentuais foram respectivamente de 23% e 8%. Alguns microrganismos já apresentavam notas 3,06 ou acima desta após 24 horas de incubação com a fonte de carbono petróleo (INPA R629, INPA R634, INPA R656, INPA R664, INPA R667, INPA R672 e INPA R674) mostrando-se assim, superiores a todos os outros quanto à habilidade de degradar o petróleo. Outros foram adquirindo elevados crescimentos (notas acima de 3,0) após alguns dias. Com base nesses resultados, foram identificadas 36 bactérias com performances superiores, que atingiram notas elevadas (3,06 a 4,00) até o sexto dia de crescimento e foram utilizados em testes posteriores, demonstrando com isso, que são potenciais degradadores de hidrocarbonetos. Os demais isolados que apresentaram notas de crescimentos elevados e moderados após o sexto dia podem ser utilizados formando consórcios em futuros testes de biodegradação de petróleo ou de suas frações, pois até o 15^o dia apresentaram crescimentos elevados usando o petróleo para crescerem. Isso mostra que os isolados de rizóbios testados utilizaram o petróleo para seus crescimentos, tornando-se necessário novos testes para verificar o potencial de degradação de cada rizóbio utilizado.

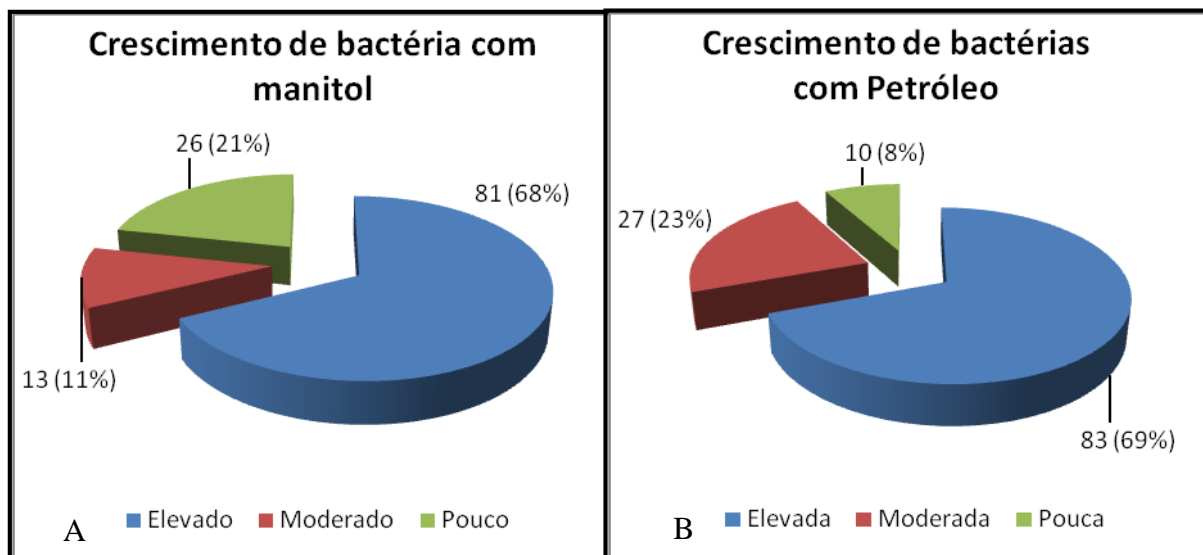


Figura 1 – Crescimento de rizóbios usando manitol ou petróleo como fontes de carbono.

Discussão

Apesar de não haver grande diferença nos testes com manitol e petróleo com relação ao crescimento elevado (68% e 69% dos isolados), observou-se que os percentuais de rizóbios com crescimentos moderados foram o dobro no meio com petróleo (23%, em comparação aos 11% com manitol), resultando em um percentual bem menor daqueles que tiveram pouco crescimento nesse meio (21% em manitol e 8% em petróleo). Esses dados demonstram que os rizóbios testados nesse trabalho usaram o petróleo com mais eficiência do que o manitol para seus crescimentos. Para demonstrar o potencial dos rizóbios na biodegradação de petróleo, vários trabalhos vêm sendo realizados. Yang e Lee (2008) testaram consórcios de rizóbios na tentativa de degradar 4-clorofenol e afirmaram que quanto maior a concentração dessa substância menor foi a biomassa das colônias de consórcios. Xiong *et al.*, (2011) realizaram testes para mensurar os efeitos da temperatura sobre a degradação de petróleo por comunidades microbianas, concluindo que a temperatura influencia na composição das comunidades microbianas do solo. Ahmad *et al.*, (1997) isolaram e caracterizaram várias linhagens de *Rhizobium meliloti* em áreas contaminadas com hidrocarbonetos aromáticos e cloroaromáticos, sendo os primeiros a registrarem isolados de *Rhizobium meliloti* com potencial para degradação de hidrocarbonetos. Isso mostra que os isolados utilizados se adaptaram à fonte de carbono petróleo, tornando-se necessário novos testes para verificar o potencial de degradação de cada rizóbio utilizado.

Conclusões

Dos 120 isolados de rizóbios, 93 apresentaram capacidade de degradar o petróleo no meio.

Trinta e seis isolados mostraram essa habilidade elevada já com seis dias de crescimento.

Os isolados INPA R629, INPA R634, INPA R656, INPA R664, INPA R667, INPA R672 e INPA R674 mostraram-se como os melhores, por apresentarem crescimentos elevados após 24 horas usando o petróleo.

Referências bibliográficas

Ahmad D, Mehmannaavaz R, Damaj M (1997) Isolation and Characterization of Symbiotic N₂-Fixing *Rhizobium meliloti* from Soils Contaminated with Aromatic and Chloroaromatic Hydrocarbons: PAHs and PCBs. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 39(I):33-43.

CETESB (2010). Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. [on line]. Brasil, Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>> Acesso em: 13 jan. 2010.

Duarte, WM (2012) Identificação de Actinomicetos Isolados de Solo Impactado com Resíduos Petroquímicos e Seleção de Potenciais Degradadores de Misturas de Diesel e de Biodiesel. Porto Alegre, Brasil. (M.Sc Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. UFRGS).

Moraes BE, Tornisielo TMS (2009). Biodegradation of Oil Refinery Residues Using Mixed- Culture of Microorganisms Isolated from a Landfarming. *Brazilian archives of Biology and technology*, 52(6):1571-1578.

Oliveira LA, Magalhães HP (1999) Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. *Revista de Microbiologia* 30:203–208.

Reginatto C, Colla M.L., Thomé A. (2011). Biorremediação de Resíduos Oleosos em Solos *Revista CIATEC – UFP*, 3(2):19-31.

Somasegaran P, Hoben HJ (1985) Methods in legume-Rhizobium technology. NifTAL Project and MIRCEN, Hawaii, 365p.

Xiong Y, Wang H, Hao X, Sun Y (2011) Effects of temperature on oil-degrading microbial communities and the biodegradation of petroleum. 5^a Conferência Internacional sobre Bioinformática e Engenharia Biomédica (iCBBE). Wuhan, China.

Yang CF, Lee CM (2008) Enrichment, isolation, and characterization of 4-chlorophenol-degrading bacterium *Rhizobium sp.* 4-CP-20. *Biodegradation*, Taiwan, 19:329–336.