

Micro-organismos de solos amazônicos com habilidade em degradar gasolina obtida da Refinaria de Manaus (REMAN)

Oliveira F.R.¹; Oliveira L.A.¹

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA
E-mails: fabirochaoliveira@gmail.com, luizoli@inpa.gov.br

Resumo

A contaminação ambiental por derivados do petróleo, como a gasolina, diesel, entre outros, causa grande impacto ecológico e as técnicas para sua remediação têm recebido destaque nas últimas décadas. O presente trabalho teve como objetivo testar isolados de rizobactérias com habilidade em degradar gasolina. Foi utilizado o método de estriagem em placa, contendo meio de cultura YMA modificado com 0,1 mL de gasolina como fonte de carbono. Em seguida foi verificada a capacidade dos microrganismos em degradar e tolerar esse composto, avaliando seu crescimento nas placas de Petri. Os resultados mostraram que os isolados testados são tolerantes à presença de gasolina. Do total de 90 isolados bacterianos avaliados, 12 mostraram crescimento máximo usando a gasolina como fonte de carbono (INPA_R561, R586, R589, R610, R614, R620, R621, R626, R630, R633, R652 e R732). Os demais mostraram ser moderados ou sensíveis ao cultivo contendo gasolina. Trata-se ainda de um trabalho inicial na busca de isolados de Rizobactérias capazes de degradar a gasolina, visando utilizá-las no processo de biorremediação de solos amazônicos contaminados.

Palavras-chave: Biorremediação, rizobactérias, tolerância à gasolina.

Introdução

O petróleo é um composto orgânico, formado por processos biogeoquímicos, constituído em sua maior parte por uma mistura complexa de hidrocarbonetos. A contaminação ambiental por esta substância e por seus derivados (gasolina, álcool, diesel, etc.) causa grande impacto ecológico e as técnicas para sua remediação têm recebido destaque nas últimas décadas. A maior

parte dos compostos de petróleo é passível de biodegradação; no entanto, trata-se de um processo lento, podendo levar décadas até a total descontaminação do ambiente.

A comercialização da gasolina tem como consequências negativas, a possibilidade de derramamento nos solos e águas regionais. Não há ainda no Estado do Amazonas, estudos sobre o impacto negativo da contaminação dos solos e rios por esse composto químico, bem como as características da população microbiana tolerante e possivelmente responsável pelo processo de biorremediação natural.

Os processos biológicos de descontaminação, enquadrados na categoria de biorremediação, utilizam, geralmente, micro-organismos autóctones ou introduzidos com capacidade de biodegradar parcial ou totalmente as substâncias contaminantes. A biorremediação é uma tecnologia que utiliza micro-organismos para minimizar ou remover poluentes, assim como os hidrocarbonetos dos compostos derivados do petróleo no ambiente sem afetar o equilíbrio ecológico (Autry e Ellis, 1992; Desai e Banat, 1997).

Foi avaliada a capacidade de 90 isolados de rizobactérias em degradarem a gasolina comercializada na região amazônica. Os resultados obtidos visam, portanto, indicar os micro-organismos com maiores potenciais de degradação desse produto para serem utilizados no processo de biorremediação de solos e/ou rios contaminados.

Material e Métodos

Os isolados de rizobactérias foram obtidos do banco de micro-organismos do LEBMAM (Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Micro-organismos da Amazônia) no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia /INPA. Cada isolado foi inoculado em placas de Petri contendo meio de cultura YMA (Vincent, 1970) e incubados a 26,5°- 28° C até o crescimento das colônias (por cerca de 3 dias) para posteriores estudos e análises com gasolina. O meio de cultivo YMA é historicamente utilizado para o isolamento, purificação e crescimento de bactérias indutoras de nódulos em leguminosas, genericamente denominadas de rizóbios. As bactérias utilizadas foram isoladas dos nódulos de leguminosas coletados em diferentes localidades de Manaus/AM e municípios circunvizinhos.

Para avaliar a capacidade de degradação da gasolina, foram testados 90 isolados de rizobactérias por meio do método proposto por Oliveira e Magalhães (1999), realizado em placas de Petri contendo meio de cultura YMA modificado, onde foi utilizado 0,1 mL de gasolina como

fonte de carbono ao invés de manitol. Como controle usou-se o meio com manitol e sem gasolina, com todos os tratamentos realizados em quadruplicata. As avaliações foram feitas após 10 dias de crescimento à temperatura ambiente (± 26 °C). O processo de avaliação consistiu na atribuição de notas 1,00 (sem crescimento visível) a 4,00 (máximo crescimento). Foram também atribuídas notas intermediárias, subdivididas em 0,25, ou seja, 1,00, 1,25, 1,50, 1,75, 2,00 até 4,00. Consideraram-se como os de melhores crescimentos, os que apresentaram notas médias acima de 3,06.

Resultados e Discussão

Conforme o método proposto por Oliveira e Magalhães (1999), foi observado que todos os isolados avaliados apresentaram crescimento no meio de cultura YMA modificado, adicionado com 0,1 mL de gasolina (Figura 1 e Tabela 1).

Na figura 1 observa-se a nota 4 de crescimento bacteriano, identificada como bactéria altamente tolerante ao cultivo adicionado de gasolina como fonte de carbono.

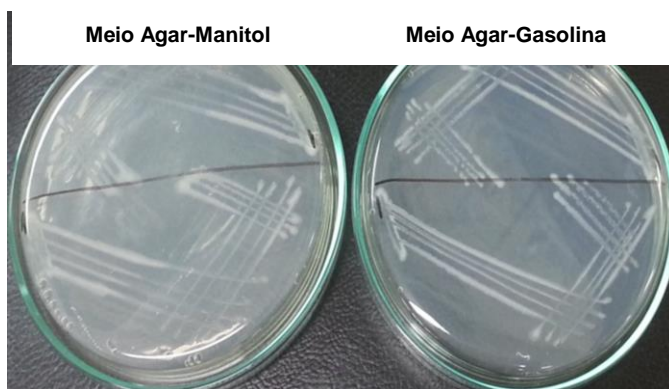


Figura 1. Crescimento máximo mostrado pela bactéria INPA_R586 cultivada em meio Agar-Manitol e Agar-Gasolina por um período de 10 dias em temperatura ambiente.

Do total de 90 isolados bacterianos avaliados, 12 (~13%) foram bastante tolerantes e usaram a gasolina como fonte de carbono, tendo em vista que apresentaram um crescimento alto na presença de gasolina no meio sólido (nota acima de 3,06), sendo eles INPA_R561, R586, R589, R610, R614, R620, R621, R626, R630, R633, R652 e R732. Dos demais isolados (cerca de 90% do total), 41 mostraram crescimentos moderados (notas 2,06 - 3,00) e outros 37 foram sensíveis (notas 1,00 - 2,00) ao cultivo contendo gasolina como fonte de carbono (Tabela 1).

Tabela 1 - Crescimento de rizobactérias em meio Agar-manitol (M) e Agar-gasolina (G) após 10 dias de incubação à temperatura ambiente. (Notas segundo Oliveira e Magalhães, 1999).

Isolados	M	G	Isolados	M	G	Isolados	M	G
INPA R007	1,3	1,3	INPA R571	2,0	2,0	INPA R621	3,8	3,4
INPA R020	2,6	2,4	INPA R572	1,3	1,3	INPA R624	2,0	1,7
INPA R028	2,3	2,8	INPA R573	2,0	2,0	INPA R625	2,0	2,0
INPA R076	2,3	2,4	INPA R575	2,7	2,3	INPA R626	3,9	3,9
INPA R178	2,3	2,3	INPA R576	2,1	2,1	INPA R628	2,9	2,4
INPA R183	3,0	2,7	INPA R577	2,9	2,9	INPA R630	3,8	3,7
INPA R529	2,1	2,5	INPA R578	1,7	1,3	INPA R631	3,0	2,5
INPA R537	2,5	2,4	INPA R580	3,0	2,5	INPA R633	3,9	3,1
INPA R545	2,6	2,4	INPA R581	2,0	2,0	INPA R634	3,0	2,6
INPA R546	2,4	2,1	INPA R582	2,8	2,9	INPA R640	3,0	2,5
INPA R547	3,0	2,8	INPA R583	1,7	1,3	INPA R642	2,0	2,0
INPA R548	2,0	2,0	INPA R586	4,0	4,0	INPA R644	3,0	2,5
INPA R549	3,0	2,5	INPA R587	2,0	1,8	INPA R645	3,0	2,8
INPA R550	3,0	2,5	INPA R588	2,4	2,3	INPA R646	1,8	1,6
INPA R551	2,0	1,5	INPA R589	3,1	3,1	INPA R649	1,3	1,3
INPA R552	2,6	2,9	INPA R590	2,5	3,0	INPA R650	2,6	2,1
INPA R553	3,0	2,5	INPA R592	1,9	1,9	INPA R650	2,0	2,0
INPA R554	3,0	3,0	INPA R593	2,0	1,8	INPA R651	3,0	2,5
INPA R555	2,6	2,1	INPA R595	3,0	2,9	INPA R652	4,0	3,5
INPA R556	3,0	2,5	INPA R597	1,9	1,4	INPA R654	1,4	1,5
INPA R557	2,0	2,0	INPA R599	2,0	2,0	INPA R655	2,0	1,5
INPA R558	2,5	2,1	INPA R607	1,3	1,3	INPA R656	1,8	1,6
INPA R559	1,7	2,0	INPA R610	3,8	3,2	INPA R662	2,2	2,3
INPA R560	3,0	2,5	INPA R612	3,0	2,5	INPA R666	3,0	2,5
INPA R561	3,9	3,1	INPA R613	2,0	1,5	INPA R667	1,6	1,6
INPA R562	1,4	1,4	INPA R614	3,1	3,3	INPA R668	2,0	1,6
INPA R563	1,9	1,9	INPA R615	2,0	1,6	INPA R674	1,3	1,3
INPA R566	2,5	3,0	INPA R618	2,0	1,5	INPA R675	1,4	1,6
INPA R568	2,5	2,1	INPA R619	2,0	1,6	INPA R676	1,4	1,3
INPA R569	3,0	2,7	INPA R620	3,2	3,8	INPA R732	4,0	3,7

De acordo com os dados da tabela 1, observa-se que para muitos isolados, não houve diferença de crescimento nos dois meios utilizados (Agar-Manitol e Agar-Gasolina), sugerindo que essas bactérias apresentam uma boa adaptação, ou seja, um crescimento satisfatório quando utilizada a gasolina como fonte de carbono, sob as condições testadas, sendo que os melhores isolados foram INPA_R586, R626, R652 e R732.

A gasolina é um dos principais produtos resultantes da destilação do petróleo, podendo apresentar de 6-12 átomos de carbono em sua cadeia (Farias, 2008); trata-se de um composto altamente complexo e que pode servir como fonte utilizável no metabolismo de determinados micro-organismos. Esses podem ser utilizados como fontes de biorremediação, por meio do uso de suas enzimas capazes de degradar essa substância presente em solos ou outros ambientes contaminados.

Ecologicamente, micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos são amplamente distribuídos e as dificuldades encontradas para caracterizar comunidades microbianas de ambientes impactados por esses compostos são agravadas pela grande quantidade de substratos específicos e interações metabólicas possíveis (Wetler-Tonini *et al.*, 2011). Tais micro-organismos podem ser encontrados no próprio ambiente impactado, sendo na maioria das vezes, os responsáveis pelo desaparecimento dos contaminantes e são capazes de degradar a maioria desses compostos para suprir as suas necessidades energéticas e de crescimento, iniciando assim o processo de biodegradação (Bernoth *et al.*, 2000). Alguns trabalhos foram realizados utilizando isolados de rizóbios na degradação de compostos derivados do petróleo (Lindström *et al.*, 2003; Poonthigpun *et al.*, 2006; Coelho *et al.*, 2010; Wen *et al.*, 2011).

A grande motivação de pesquisas e estudos de biodegradação é, sem dúvida, a busca de micro-organismos versáteis capazes de degradar, de maneira eficiente, uma grande variedade de poluentes a baixo custo operacional, utilizando aqueles que não prejudiquem a vida existente nas áreas contaminadas. Entre as rizobactérias de interesse, o gênero *Rhizobium* ou similares apresenta características adequadas para ser utilizado num processo de biorremediação, pois além de apresentar todas as características citadas, não são patogênicas, não prejudicando assim o homem, a fauna e a flora existentes no meio ambiente.

Trata-se ainda de um trabalho inicial na busca de isolados de rizobactérias capazes de degradar os derivados do petróleo, assim como a gasolina. Há, entretanto, necessidade de uma busca de um maior número de isolados e testes mais aprofundados para avaliar a eficiência

enzimática dessas bactérias, como forma de indicar as mais aptas para serem utilizadas no processo de biorremediação de solos amazônicos contaminados.

Conclusões

Do total de 90 isolados de rizobactérias, apenas doze mostraram-se altamente tolerantes quando presentes no meio de cultivo Agar-Gasolina, dos demais isolados, 41 mostraram crescimentos moderados (nota 2,06 - 3,00) e outros 37 sensíveis (1,00 - 2,00);

Doze isolados de rizobactérias (INPA_ R561, R586, R589, R610, R614, R620, R621, R626, R630, R633, R652 e R732) mostraram crescimentos elevados usando a gasolina como fonte de carbono e apresentam potencial para serem usadas futuramente em inoculantes visando descontaminar solos contaminados com gasolina.

Alguns isolados mostraram pouco crescimento nos dois meios, indicando dificuldades de usarem o manitol e a gasolina como fontes de carbono nas condições experimentais.

Referências

Autry A.R., Ellis G.M. (1992). Bioremediation: An effective remedial alternative for petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Environmental Progress*, 11(4):318-323.

Bernoth L., Firth I., Mcallister P., Rhodes S. (2000). Biotechnologies for remediation and pollution control in the mining industry. *Miner. Metall. Proc.*, 17:105-111.

Coelho F.J.R.C., Sousa S., Santos L., Santos A.L., Almeida A., Gomes N.C.M., Cunha A. (2010). PAH degrading bacteria in an estuarine system., Eds., N. Hamamura, S. Suzuki, S. Mendo, C. M. Barroso, H. Iwata and S. Tanabe, *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry — Biological Responses to Contaminants*. p. 77–87.

Desai J.D., Banat I.M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1):47-64.

Farias R.F. (2008). Introdução à química do Petróleo. *Ciência Moderna*, Rio de Janeiro, 1º Ed., 106 p.

Lindström K., Jussila M.M., Hintsala H., Kaksonen A., Mokolke L., Mäkeläinen K., Pitkäljärvi J., Suominen L. (2003). Potential of the *Galega – Rhizobium galegae* System for Bioremediation of Oil-Contaminated Soil. *Food Technol. Biotechnol.* 41(1):11–16.

Oliveira L.A., Magalhães H.P. (1999). Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. *Revista de Microbiologia*, 30:203-208.

Poonthrigpun S., Pattaragulwanit K., Thanyanuch S., Juntongjin K.K., Thaniyavarn S., Petsom A., Pinphanicharkarn P. (2006). Novel Intermediates of Acenaphthylene Degradation by *Rhizobium* sp. Strain CU-A1: Evidence for Naphthalene-1,8-Dicarboxylic Acid Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9):6034–6039.

Vincent J.M. (1970). *A manual for practical study of root nodule bacteria*. IBP Handbook N. 15. Blackwell Scient. Publ. 140p.

Wen Y., Zhang J., Yan Q., Li S., Hong Q. (2011). *Rhizobium phenanthrenilyticum* sp. nov., a novel phenanthrene-degrading bacterium isolated from a petroleum residue treatment system. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 57:319–329.

Wetler-Tonini R.M.C., Rezende C.E., Gravitol A.D. (2011). Biodegradação Bacteriana de Petróleo e seus derivados. *Revista Virtual Química*. 3(2):78-87.