

Isolamento de microrganismos com capacidade de biodegradação de óleo diesel em solo contaminado

Isolation of microorganisms with biodegradation capacity of diesel oil in contaminated soil

RESUMO

Vinicius Raffler
vinicius.raffler@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

Eder da Costa dos Santos
edersantos@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

A contaminação dos recursos hídricos e solos pela utilização de combustíveis fósseis como o petróleo, vem aumentando no decorrer dos anos, assim além de trazer prejuízos ambientais, esses compostos agravam a saúde humana justamente por muitos deles serem cancerígenos. Existem muitas técnicas de descontaminação de solo que apresenta índices de derivado de petróleo, podendo ser utilizadas técnicas físico-químicas e biológicas para a remediação dessas áreas, sendo o método de biorremediação o mais adequado para esse tipo de contaminação. O objetivo do estudo foi avaliar a capacidade de degradação de hidrocarbonetos de petróleo em solo contaminado por óleo diesel, por meio de microrganismos isolados, caracterizando morfologicamente os mesmos, montando consórcios microbianos com meio mineral seletivo, e encapsulando os microrganismos isolados em microcosmos. Em síntese, isolou-se 14 microrganismos capazes de biodegradar o diesel, e por meio da análise dos consórcios microbianos possibilitou-se avaliar que os isolados bacterianos comparados com os fúngicos se mostraram mais favorável a biorremediação.

PALAVRAS-CHAVE: Hidrocarbonetos de petróleo. Biorremediação. Encapsulamento.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

The contamination of water resources and soils by the use of fossil fuels such as oil has been increasing over the years, so in addition to bringing environmental damage, these compounds aggravate human health precisely because many of them are Carcinogenic. There are many soil decontamination techniques that present indexes of petroleum derivative and can be used physicochemical and biological techniques for the remediation of these areas. The bioremediation method is the most suitable for this type of contamination. The objective of this study was to evaluate the degradation capacity of petroleum hydrocarbons in soil contaminated by diesel oil, isolating microorganisms with biodegradation capacity of hydrocarbon, morphologically characterizing the isolates with Gram staining technique, in addition to assembling microbial consortia from the isolates with Tanner mineral medium and diesel oil, and encapsulate the microorganisms isolated in microcosm. In summary, 14 microorganisms capable of biodegradable diesel were

isolated, and by means of the microbial consortia, it was possible to analyze that the bacterial isolates were more favorable to bioremediation.

KEYWORDS: Oil hydrocarbons. Bioremediation. Tunneling.

INTRODUÇÃO

A indústria petrolífera gera grandes quantidades de resíduos de hidrocarbonetos durante suas atividades, esses resíduos são despejados em maior frequência nos solos e nas águas principalmente por vazamentos envolvendo o transporte de combustíveis, podendo ser por navios, caminhões ou dutos. Além do meio industrial, nas últimas décadas a contaminação por via doméstica vem aumentando em grande escala (GUEDES *et al*, 2010).

O petróleo é constituído parcialmente de hidrocarbonetos, sendo esses formados por um composto aromático chamado de benzeno. O benzeno é um composto cancerígeno e volátil que entra no organismo humano através da respiração, ele está presente na classe dos BTEX (benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos), sendo esses compostos de alta mobilidade, podendo atingir lençóis freáticos com facilidade, contaminado assim a água geralmente utilizada para o abastecimento populacional (DURMUSOGLU; TASPINAR; KARADEMIR, 2010).

A fim de resolver esse problema pode-se utilizar técnicas de remediação e biorremediação. O processo de biorremediação consiste em utilizar microrganismos e plantas para reduzir ou remover os compostos poluentes em ambientes contaminados, utilizando técnicas biológicas, físicos e/ou químicos no processo. O processo biológico se torna a alternativa mais viável devido ao custo inferior, além de ser mais eficaz para tratamentos envolvendo compostos orgânicos como o benzeno (CLAIRE GAYLARDE; LOURDES BELLINASSO; PAULO MANFIO, 2005). A técnica biológica de biorremediação por bioaugmentação visa inocular microrganismos de forma isolada ou de consórcio, simulando uma situação real em experimento no laboratório. (TYAGI; DA FONSECA; DE CARVALHO, 2011).

O presente trabalho visa isolar e avaliar microrganismos com capacidade de biodegradação do diesel em solo contaminado, além de selecionar e caracterizar morfológicamente os isolados microbianos com maior taxa de degradação, apresentadas durante a análise dos consórcios microbianos, e por fim encapsulá-los em microcosmos.

MATERIAL E MÉTODOS

A amostra de solo com histórico de contaminação por óleo diesel foi coletada em uma propriedade rural no município de Francisco Beltrão – PR em três locais distintos. Logo após foram armazenadas e transportadas para o laboratório de solos, onde as amostras foram peneiradas e homogeneizadas entre si. Após esse

processo as amostras foram levadas para o laboratório de microbiologia para posteriores análises.

Para o processo de isolamento dos microrganismos, utilizou-se solução salina de 0,5% e 5% da amostra de solo, retirando uma alíquota de 0,1mL, vertendo a mesma em placas de Petri contendo 20mL de meio de cultura. Utilizou-se três meios de cultura distintos: ágar nutriente, batata dextrose ágar, e meio contendo solo, previamente esterilizadas na autoclave, a uma temperatura de 121°C durante 15 minutos. Após inoculação, incubou-se as placas a 30° C por 24 horas. As colônias provenientes crescidas com aspectos morfológicos diferentes foram isoladas em placas de Petri contendo meio ágar nutriente.

Submeteu-se os microrganismos isolados a um meio seletivo, no qual consistia meio mineral Tanner e 0,1mL de óleo diesel como fonte exclusiva de carbono. Para as colônias que cresceram nesse meio, foram feitas análises de características fenotípicas e morfológicas por meio do processo de coloração de Gram. Posteriormente as análises, os microrganismos isolados foram replicados e armazenados a temperatura de 4°C.

Para montagem dos consórcios microbianos, agrupou-se os microrganismos isolados anteriormente em meio líquido, adicionando 50 mL de meio mineral contendo 100 µL de óleo diesel. Preparou-se 4 consórcios, sendo eles, o bacteriano, o fúngico, o bacteriano e fúngico (nesse contendo todos os microrganismos isolados), e por fim um consórcio controle, no qual continha somente o meio inicial. Posteriormente incubou-se os quatro consórcios em mesa agitadora, a uma velocidade de 150 rpm, a temperatura ambiente de 25°C.

A curva de crescimento dos isolados microbianos nos consórcios, foi realizada por meio de análise diária (a cada 24 horas), realizando a contagem em placas de Petri contendo meio ágar nutriente, durante 5 dias. Esses ensaios foram feitos em triplicatas e expressadas em UFC por mL.

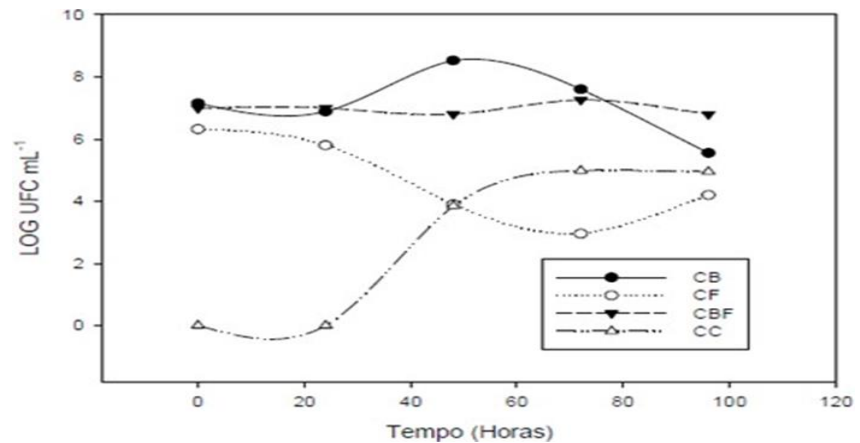
Por fim para a confecção de cápsulas contendo microrganismos, preparou-se uma solução contendo um meio espessante e inóculo microbiano dos consórcios. Obtiveram-se as cápsulas com auxílio de uma bomba peristáltica, na qual as gotas da solução formavam as cápsulas ao entrar em contato com a solução reticulante.

RESULTADOS

Na amostra de solo utilizada proveniente de contaminação por óleo diesel, após repliques em meio mineral Tanner (meio específico que utiliza como fonte energética o diesel), obteve-se um total de 21 cepas isoladas, sendo 14 cepas bacterianas e 7 fúngicas. As características morfológicas desses isolados foram obtidas a partir da coloração de Gram para as bactérias e avaliação visual para os fungos. Para as 14 cepas de bactérias, 8 apresentaram-se como Gram negativas e seis como Gram positivas, destando-se as cores entre amarela e creme, e superfície como lisa, já a morfologia sobressaiu-se em 50% dos 14 isolados como cocos. Para os fungos as cores dos 7 isolados variaram entre verde, branco e preta.

Utilizando as bactérias isoladas seguiu-se o procedimento da biodegradação do diesel no solo, empregou-se consórcios que responderam de diferentes maneiras. Na figura a seguir apresenta-se a relação do crescimento microbiano e o tempo de exposição entre os 4 consórcios montados:

Figura 1. Gráfico gerado da curva de crescimento dos consórcios microbianos. CB – Consórcio bacteriano; CF – Consórcio fúngico; CBF – Consórcio bacteriano + fúngico; CC – Consórcio Controle



Fonte: Shimabukuro

No processo de encapsulamento dos microrganismos, obteve-se 67 g de cápsulas ativas. Um exemplo dessas cápsulas se apresenta na figura a seguir:

Figura 2. Cápsulas providas do consórcio bacteriano



Fonte: Shimabukuro

DISCUSSÃO

Segundo DÖRR (2008), em um solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo, as bactérias com maior taxa de crescimento são as Gram negativas, justamente por serem mais tolerantes a compostos lipofílicos comparado com as Gram positivas, assim efetivando como maior crescimento esse gênero de bactérias.

Para os consórcios microbianos, o bacteriano apresentou maior pico de unidade formadora de colônia (UFC) através do tempo analisado, a maior oscilação desse consórcio está relacionada ao metabolismo superior das bactérias comparado ao dos fungos. No consórcio fúngico observa-se que ao chegar em 48 horas de exposição, a contagem microbiana se torna inferior ao controle, essa ação aconteceu possivelmente devido as células de microrganismos não terem se adaptado a exposição ao combustível. Já o consórcio com bactérias e fungos (misto), apresentou estabilidade no crescimento sem muita taxa de oscilação,

supostamente causado pelo equilíbrio dinâmico na taxa de morte e divisão celular, devido à presença tanto de microrganismos com metabolismo acelerado como lento. A adição de óleo diesel foi realizada no início do tratamento, evidenciando que o crescimento microbiano para todos os consórcios baseado na figura 1 tendem a sofrer declínio comparada com o tempo inicial, assim se coincidindo com a perda de nutrientes no meio, supostamente provindo da falta de fonte de carbono.

Após analisar o comportamento dos microrganismos nos consórcios, produziu-se com eles microcápsulas, que tem por objetivo facilitar a distribuição das células microbianas com potencial de biodegradação no local onde ocorrerá a biorremediação, além de trazer uma proteção física fazendo com que os microrganismos se adaptem facilmente no local de aplicação.

CONCLUSÃO

O isolamento de microrganismos biodegradadores de óleo diesel em solo contaminado e a aplicação deles em testes por consórcios microbianos se mostrou favorável para resolver problema ambiental. Dentre os microrganismos isolados e selecionados morfológicamente, os que apresentam maior variação principalmente pela velocidade de consumo dos hidrocarbonetos na biorremediação são os isolados bacterianos, sendo assim uma opção viável aplicar esses isolados em forma de microcosmos em solos contaminados.

REFERÊNCIAS

- DÖRR, F. **Consórcios degradadores de BTEX: isolamento, caracterização e avaliação do potencial de degradação**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- DURMUSOGLU, E; TASPINAR, F; KARADEMIR, A. **Health risk assessment of BTEX emissions in the landfill environment**. Journal of hazardous materials, v. 176, n. 1, p. 870-877, 2010.
- GAYLARDE, C.C.; BELLINASSO, M.L.; MANFIO, G.P. **Biorremediação**. [S. l.]: Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, 2005. Disponível em: <http://www1.esb.ucp.pt/twt/olimpiadasbio07/MyFiles/MyAutoSiteFiles/FontesInformacao253906202/samorais/Biorremediacao.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2019.
- GUEDES, C. L. B. *et al.* Tratamento de Solo Contaminado com Petróleo Utilizando Tensoativos e Peróxido de Hidrogênio. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 31, n. 2, p.87-100, jul. 2010.
- SHIMABUKURO, R. K. K.. **BIODEGRADAÇÃO DE DIESEL NO SOLO POR CONSÓRCIO MICROBIANO**. 2017. 66 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2017

TYAGI, M; DA FONSECA, M. R.; DE CARVALHO, C. CCR. **Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes.** Biodegradation, v. 22, n. 2, p. 231-241, 2011.

AGRADECIMENTOS

A Fundação Araucária pela bolsa fornecida, ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Francisco Beltrão aonde foram realizadas as pesquisas.