

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS A PARTIR DE SOLOS CONTAMINADOS COM BORRA OLEOSA PETROQUÍMICA VISANDO FUTURA APLICAÇÃO EM PROCESSOS DE BIORREMEDIÇÃO

ELISANDRA MARIA ENGLER¹; EDUARDA DUVAL HALLAL²; VANESSA SACRAMENTO CERQUEIRA³

¹Universidade Federal de Pelotas – elyengler@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas- eduardahd@hotmail.com;

³Universidade Federal de Pelotas- vanescerqueira@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A borra oleosa é caracterizada como um resíduo de difícil degradação gerado em grandes quantidades pelas indústrias petroquímicas e refinarias de petróleo. Apresenta em sua composição hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos, resinas e asfaltenos (AYOTAMUNO et al., 2007). Dentre estes, os de maior preocupação são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, os quais contribuem significativamente para as propriedades toxicológicas do resíduo, apresentando, muitos destes, potencial mutagênico e carcinogênico, sendo assim classificados como poluentes ambientais prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA). Em vista de sua composição, a borra oleosa é classificada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) como resíduo perigoso classe I.

Baseado nisto, o setor industrial tem buscado alternativas para tratamento e/ou destinação final deste resíduo de forma ambiental e economicamente sustentável através da utilização de tecnologias mais limpas. A técnica mais comumente utilizada em refinarias e indústrias petroquímicas brasileiras para o tratamento da borra oleosa é o Landfarming, que consiste em um método de biorremediação onde os contaminantes são aplicados e incorporados na camada superficial do solo, e através de operações de aragem e gradagem são homogeneizados fazendo com que os microrganismos presentes no solo sejam estimulados a degradar os contaminantes. O processo de biorremediação visa transformar o contaminante em substâncias inertes como material orgânico estabilizado, água e CO₂ (JACQUES et al., 2007).

Indústrias localizadas no sul do Brasil utilizam este processo para o tratamento de borra oleosa. Entretanto, visto que é um processo realizado em sistema aberto estando pois exposto as condições ambientais, este tem-se mostrado com baixa eficiência. Entre os vários prováveis fatores responsáveis por sua reduzida taxa de degradação no solo, pode-se destacar como os mais importantes a baixa biodisponibilidade destes compostos, a baixa seletividade dos microrganismos aos compostos e variações das condições ambientais (RIZZO et al., 2006, TYAGI et al., 2011). Em vista disto, faz-se importante o desenvolvimento de pesquisas visando otimizar o processo de biorremediação deste resíduo pouco estudado no Brasil. Cabe salientar que são escassos os estudos de degradabilidade microbiana de borra oleosa (mistura complexa de hidrocarbonetos), gerada em refinarias e indústrias petroquímicas.

O componente chave na biorremediação é o microrganismo, o qual produz as enzimas envolvidas nas reações degradativas levando a eliminação ou detoxificação do poluente químico (OKOH & TREJO-HERNANDEZ, 2006). Como

alternativa para aumentar a eficiência do processo de degradação em ambientes contaminados tem sido proposta a estratégia de bioaugmentação, que consiste na adição de microrganismos no ambiente contaminado com o objetivo de aumentar a taxa degradativa. Para o sucesso desta técnica, uma etapa crucial é a de isolamento e seleção de um microrganismo ou um consórcio de microrganismos eficientes na degradação da molécula em estudo (MELO & AZEVEDO, 2008).

A estratégia de bioaugmentação pode ser realizada com a utilização de microrganismos endógenos e/ou exógenos. Em especial, a busca por microrganismos nativos do ambiente contaminado com potencial degradador é de extremo interesse, visto suas vantagens frente aos microrganismos exógenos, tais como sua maior adaptabilidade ao meio, maior resistência às variações das condições ambientais locais, menor susceptibilidade a variações genéticas causados por condições de estresse do meio, exploração da potencialidade regional, entre outros.

Assim, o presente trabalho tem por objetivo isolar bactérias do solo Landfarming contaminado com borra oleosa para aplicação em processos de biorremediação de resíduos petroquímicos.

2. METODOLOGIA

As amostras de solo foram coletadas assepticamente, a uma profundidade de 30 cm, de células de *Landfarming* pertencentes a uma unidade de Controle e Tratamento de resíduos sólidos de um complexo petroquímico localizado no Sul do Brasil. As amostras foram transportadas até o laboratório e mantidas sob refrigeração (4°C). As amostras foram então homogeneizadas e retiradas alíquotas para o isolamento de microrganismos.

O isolamento de bactérias foi realizado a partir do solo do *Landfarming* através da técnica de enriquecimento. A técnica consistiu em adicionar 1g de solo em 50 mL de meio mínimo mineral (MM1) estéril [composição em g.L⁻¹: KCl, 0,7; KH₂PO₄, 2,0; Na₂HPO₄, 3,0; NH₄NO₃, 1,0; solução de micronutrientes, 1mL.L⁻¹ (MgSO₄, 4,0; FeSO₄, 0,2; MnCl₂, 0,2; CaCl₂, 0,2)] (RICHARD & VOGEL, 1999) em frascos tipo erlenmeyer de 125 mL contendo 1%(v/v) de borra oleosa. Os frascos foram mantidos em incubador rotatório a 160 rpm e 30°C. Uma alíquota (1 mL) foi transferida a cada 5 dias para novo meio MM1 e incubado nas mesmas condições. Após 3 transferências, realizadas a cada 5 dias (15 dias), foi realizada a técnica de espalhamento em superfície em placas de petri contendo ágar nutriente. As colônias foram submetidas à técnica de esgotamento em placas contendo ágar nutriente para obtenção de colônias puras.

Os isolados bacterianos purificados foram caracterizados quanto à morfologia celular e coloração diferencial de Gram. Os isolados bacterianos foram armazenados refrigerados em tubos de ensaio contendo ágar nutriente inclinado a 4°C e armazenados congelados em microtubos contendo caldo nutritivo e glicerol 20%. Foram realizados ensaios para a padronização do inóculo. Os isolados foram submetidos a testes quanto à capacidade de degradação de hidrocarbonetos e à capacidade de produção de biossurfactante.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para obter microrganismos tolerantes e com capacidade degradativa de hidrocarbonetos optou-se por utilizar amostras ambientais com histórico de contaminação através da técnica de enriquecimento seletivo. Em ambientes contaminados, a maior parte da microbiota adquire tolerância aos contaminantes devido à pressão natural ocasionada por aplicações sucessivas, utilizando o poluente como fonte de carbono e energia para o seu metabolismo, bem como desenvolvendo aparato enzimático necessário à degradação destes poluentes. Os microrganismos são extremamente diversos e podem sobreviver em ambientes inóspitos. Locais contaminados frequentemente apresentam uma ampla comunidade microbiana a qual é capaz de utilizar o contaminante como fonte de carbono e energia (SINGH & LIN, 2008).

A seleção utilizando a técnica de enriquecimento seletivo e esgotamento em placas, e posteriormente a aplicação da técnica de Gram e análise microscópica possibilitaram o isolamento de 20 bactérias do solo *Landfarming*. Destas, foi possível identificar 14 Gram-Negativa em forma de bastonetes, 4 Gram-Negativa em formato de cocos e 2 Gram-Positiva em formato de cocos.

Diversos trabalhos têm demonstrado o isolamento de microrganismos em amostras de solos contaminados com hidrocarbonetos e sua potencialidade no tratamento de derrames de óleos (BENTO et al., 2005; CARVALHO et al., 2002; GUZIK et al., 2009; RASHEDI et al., 2005; SINGH & LIN, 2008). Entretanto, estudos visando o tratamento de borra oleosa são escassos. Pesquisas voltadas a exploração de microrganismos degradadores de borra oleosa faz-se de extrema importância visto a elevada produção deste resíduo e a necessidade pela busca de alternativas ambientalmente favoráveis.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível isolar 20 bactérias a partir de solo contaminado com borra oleosa petroquímica. Os isolados mostraram capacidade de tolerância e crescimento em meio contendo 1% de borra oleosa petroquímica, utilizando-a como única fonte de carbono. Em visto disto, apresentam-se promissoras para a utilização como inóculo em processos de biorremediação (bioaugmentação) de áreas contaminadas com resíduos petroquímicos visando aumentar a taxa de degradação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYOTAMUNO, M.J., OKPARANMA, R.N., NWENEKA, E.K., OGAJI, S.O.T., PROBERT, S.D. Bio-remediation of a sludge containing hydrocarbons. **Applied Energy**, 84,936-943, 2007.

BENTO, F. M., CAMARGO, F.A.O., OKEKE, B.C., FRANKENBERGER, W. T. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. **Microbiological Research**, 160, 249-255, 2005.

CARVALHO, M.F., ALVES, C.C.T., FERREIRA, M.I.M., DE MARCO, P., CASTRO, P.M.L. Isolation and initial characterization of a Bacterial Consortium

able to mineralize Fluorobenzene. **Applied and Environmental Microbiology**, 68, 1, 102-105, 2002.

GUZIK U., GRE, I., WOJCIESZY, D.S., ABU, S.E. Isolation and characterization of a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* possessing various dioxygenases for monocyclic hydrocarbon degradation. **Brazilian Journal of Microbiology**, 40, 285-291, 2009.

JACQUES, R.J.S., BENTO, F.M., ANTONIOLLI, Z.I., CAMARGO, F.A.O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, UFSM, Santa Maria, 37, 4, 1192-1201, 2007.

MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. **Microbiologia Ambiental**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, 2008.

OKOH, A.I., TREJO-HERNANDEZ, M.R. Remediation of petroleum hydrocarbon polluted systems: Exploiting the bioremediation strategies. **African Journal of Biotechnology**, 5, 25, 2520-2525, 2006.

RASHEDI, H., JAMSHIDI, E., ASSADI, M.M., BONAKDARPOUR, B. Isolation and production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian southern wells oil. **International Journal of Environmental Science Technology**, 2, 2, 121-127, 2005.

RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 44, 93-100, 1999.

RIZZO, A.C.L., LEITE, S.G.F., SORIANO, A.U., SANTOS, R.L.C., SOBRAL, L.G.S. Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores. **Série tecnologia Ambiental**. STA-37, CETEM/MCT, 2006.

SINGH, C., LIN, J. Isolation and characterization of diesel oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. **African Journal of Biotechnology**, 7, 12, 1927-1932, 2008.

TYAGI, M., FONSECA, M.M.R., CARVALHO, C.C.C.R. Bioaugmentation and Biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation**, 22, 231-241, 2011.