

# ESTUDO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO DE LINHAGENS DE FUNGOS ISOLADAS DE SOLO NORDESTINO

**Acácia Pedrazza Reiche**

Bolsista de Iniciação Científica, Biologia, Universidade do Rio de Janeiro.

**Judith Liliana Solórzano Lemos**

Orientadora, Eng<sup>a</sup>. Química, D. Sc.

## Resumo

O presente estudo visou isolar espécies de fungos filamentosos presentes em solo nordestino, capazes de degradar óleo cru, com vistas na aplicação futura na remediação de solos contaminados por petróleo. O isolamento das linhagens foi realizado por meio de diluições seriadas, cujas respectivas suspensões foram semeadas em placas, e incubadas até o surgimento das unidades formadoras de colônias que caracterizam os fungos filamentosos. A partir do isolamento foram obtidas 50 colônias, submetidas a um teste qualitativo de degradação de petróleo. Esse teste permitiu apontar 25 linhagens como potenciais agentes de degradação de óleo cru. A seguir foram realizados experimentos de degradação de petróleo empregando solo intencionalmente contaminado (5% p/p) e 5 das linhagens promissoras. De acordo com os experimentos, que foram monitorados pela geração de CO<sub>2</sub>, as linhagens fúngicas que mostraram melhor capacidade como agente degradador foram a 1 e a 4 com produção de 5 mmoles de CO<sub>2</sub> nos primeiros 15 dias de experimento.

## 1. Introdução

A biorremediação é um processo de tratamento que utiliza microrganismos que degradam e transformam compostos orgânicos existentes nos solos contaminados, aquíferos, lodos e resíduos sólidos, em compostos menos complexos e geralmente mais facilmente degradáveis, podendo chegar até a sua mineralização, ou seja, podem ser degradados a H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> e/ou CH<sub>4</sub>, dependendo do tipo de metabolização.

Desde meados dos anos 90, as estratégias de biorremediação têm sido adotadas seriamente como uma maneira eficaz e de baixo custo para a remediação de solos contaminados por petróleo e de outros compostos orgânicos; causando, ainda, menores distúrbios na superfície a ser tratada. No entanto, esta técnica tem-se deparado com empecilhos relacionados à dificuldade de aplicação em

solos impermeáveis ou que apresentem metais pesados em sua composição e à possibilidade de se gerar produtos intermediários nocivos.

A capacidade dos microrganismos de degradar compostos orgânicos é cientificamente reconhecida e vem sendo utilizada ao longo do tempo em processos de tratamento biológico de efluentes líquidos e de resíduos sólidos. Graças a essa habilidade têm sido desenvolvidos processos biotecnológicos destinados a diversas finalidades, dentre os quais destaca-se a degradação de poluentes, a lixiviação de minerais, a desobstrução de poços de petróleo e a recuperação de locais contaminados - solo, águas superficiais e subterrâneas - (de OLIVEIRA, 2002). Tais microrganismos podem ser encontrados no próprio ambiente impactado, sendo na maioria das vezes, os responsáveis pelo desaparecimento dos contaminantes. Os microrganismos são capazes de degradar a maioria desses compostos para suprir as suas necessidades energéticas e de crescimento. No entanto, em outras circunstâncias os microrganismos utilizam as mesmas vias metabólicas, normalmente destinadas ao seu crescimento e obtenção de energia, para a degradação de moléculas contaminantes, sem benefício direto. Esse fenômeno é conhecido como cometabolismo. Desta forma, os pesquisadores lançam mão das habilidades mostradas pelos microrganismos e as exploram na biorremediação (ALEF & NANNIPIERI, 1995).

A biodegradação completa conduz à detoxificação dos produtos contaminantes em dióxido de carbono e água. A degradação incompleta produz o rompimento de compostos que podem ou não ser menos tóxicos que os contaminantes originais. Neste caso, valeria a pena realizar um estudo da viabilidade da aplicação da biorremediação em tais sistemas, para evitar um problema ainda maior. No entanto, uma vez que a biorremediação pode ser efetuada através de microrganismos endógenos, capazes de gerar produtos recalcitrantes como resultado da degradação parcial, faz-se necessário o descobrimento de linhagens que possam utilizar os intermediários obtidos na degradação incompleta; pois alguns estudos apontam para a inexistência de microrganismos capazes de degradar, e muito menos mineralizar, os elementos postos em evidência (LEMOS, 2001).

O interesse no isolamento da microbiota nativa fúngica está atrelado à busca por linhagens que possuam capacidade em degradar petróleo, procurando utilizar-se das habilidades microbianas em processos de biorremediação. Além disso, obtém-se uma análise da composição da microbiota fúngica daquela localidade, oferecendo dados utilíssimos à pesquisa de base.

## **2. Objetivo**

O presente trabalho teve por objetivo isolar fungos filamentosos presentes num solo nordestino para avaliar a sua capacidade de degradação de petróleo.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Isolamento das espécies

Para a obtenção das espécies de fungos filamentosos, foram diluídos 10g de solo em 90mL de solução salina com cloranfenicol e pH ajustado em 3,5. A suspensão foi agitada em *Shaker* por 1 hora, sendo feita, a seguir uma diluição seriada. As suspensões, provenientes da diluição seriada, foram semeadas (0,2 mL) em placas de Petri, em triplicata, contendo meio de cultivo apropriado. As placas permaneceram em repouso até o surgimento das colônias (cerca de 3 dias), ocasião na que foram transferidas para tubos de ensaio, contendo meio apropriado, de tal forma a isolar aquelas que apresentavam características visualmente diferentes, buscando, assim, obter todas as espécies ali presentes.

#### 3.2 Análise do potencial biodegradador

A partir das espécies isoladas, foram realizados os testes indicadores de potencial remediador. Para esta análise foram utilizados meio mineral e placa de poliestireno com 24 cavidades. Cada espécie foi inoculada em 3 meios minerais, acrescidos ou não de uma fonte de carbono extra, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Composições dos meios minerais, g/100mL

Meio 1		Meio 2		Meio 3	
Reagentes	g/L	Reagentes	g/L	Reagentes	g/L
NaCl	5,0	NaCl	5,0	NaCl	5,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0
*NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0	*NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0	*NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0
*(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0	*(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0	*(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,2	MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,2	MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,2
*KNO <sub>3</sub>	3,0	*KNO <sub>3</sub>	3,0	*KNO <sub>3</sub>	3,0
Cloranfenicol	0,05	Cloranfenicol	0,05	Cloranfenicol	0,05
		Glicose	10,0	Extrato de Levedura	6,67

A partir da análise visual da degradação de óleo das espécies foram selecionadas 5 linhagens que demonstraram ter maior potencial degradador.

#### 3.3 Aplicação das espécies selecionadas

Visando simular as condições de reator estático, em escala de bancada, foram montados sistemas em kitsatos com 50g de solo contaminado com petróleo a 5% (p/p) e inoculados com as espécies selecionadas. A obtenção de inóculo das espécies foi feito a partir de conídios coletado nos tubos, previamente cultivados com as espécies já isoladas, que foram semeados em meio BDA líquido, permitindo que permanecessem em *shaker* por 24 horas para a proliferação da biomassa.

Para controle e comparação dos resultados também foram analisados outros sistemas, a saber: solo contaminado com petróleo a 5% (p/p), sem inóculo; solo contaminado com petróleo a 5% (p/p), adicionado de meio de cultivo estéril, e solo virgem.

Todos os sistemas foram acrescidos de água no valor correspondente a 50% da CRA, repondo semanalmente a umidade perdida, por meio do controle dos pesos dos frascos.

A quantificação do potencial degradador das espécies, se deu através do acompanhamento da produção de CO<sub>2</sub>, descrita em SANTOS *et al.* (2002).

#### 4. Resultados e Discussão

A partir das diluições seriadas e a semeadura das suspensões nas placas de Petri com meio de cultura sólido, foram visualizadas as colônias que começaram a surgir com aproximadamente 2 dias de cultivo após a sua incubação, sendo a incubação finalizada no 5º dia.. Parte do resultado obtido está apresentado na Figura 1.



Figura 1: Placas de Petri semeadas com suspensões 10<sup>-2</sup> (esquerda) e 10<sup>-3</sup> (direita), obtidas a partir da diluição seriada.

A partir destas colônias, foram isoladas aquelas que apresentavam características visualmente distintas, com cores e formas diferentes, buscando obter a maior diversidade dentre as espécies que surgiram. As linhagens obtidas foram isoladas e cultivadas em tubos inclinados e meio de cultura sólido, apropriado, como ilustra a Figura 2.

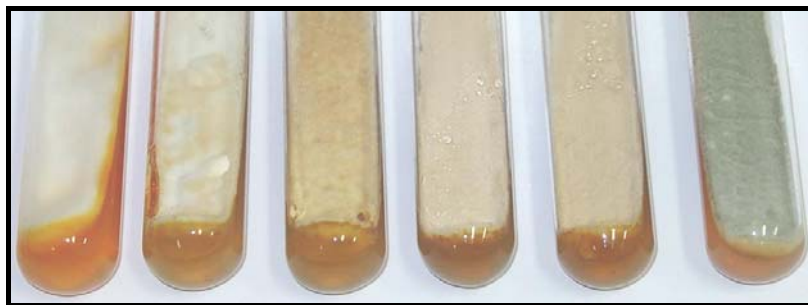


Figura 2: Tubos de ensaio com fungos isolados do solo e cultivados em meio apropriado.

As linhagens isoladas foram então submetidas ao teste de degradação de petróleo, e parte do resultado, obtido após 7 dias de cultivo, é mostrado na Figura 3. Considera-se positiva a cavidade onde o microrganismo é capaz de afetar a gota de petróleo, promovendo a sua abertura, modificação da textura, diminuição da espessura da gota, turvação do meio e crescimento visível do microrganismo na superfície do petróleo, quando comparada com o controle que não possui inóculo fúngico.

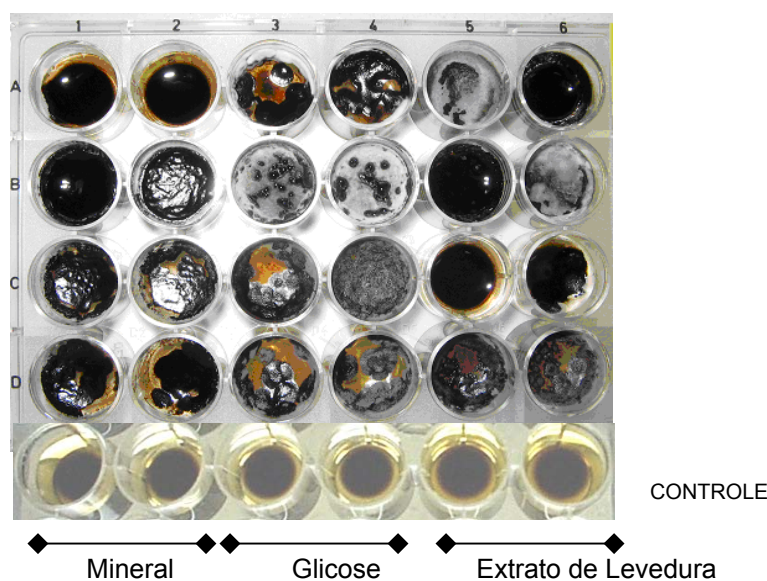


Figura 3. Teste de degradação de petróleo em placa de poliestireno, utilizando petróleo como fonte de carbono nas duas cavidades da esquerda, petróleo mais glicose nas duas do centro e petróleo e extrato de levedura nas duas da direita.

A partir da análise visual, 25 linhagens tiveram resultado positivo para a degradação do óleo cru. Dentre estas, foram selecionadas cinco linhagens identificadas pelos números 1, 2, 3, 4 e 5, que foram selecionadas para dar prosseguimento aos experimentos.

As linhagens selecionadas foram então cultivadas e aplicadas nos sistemas montados em kitsatos. A avaliação da atividade microbiológica sobre o óleo cru se deu por meio da análise de CO<sub>2</sub> acumulado nos sistemas, conforme mostra o gráfico da Figura 4.

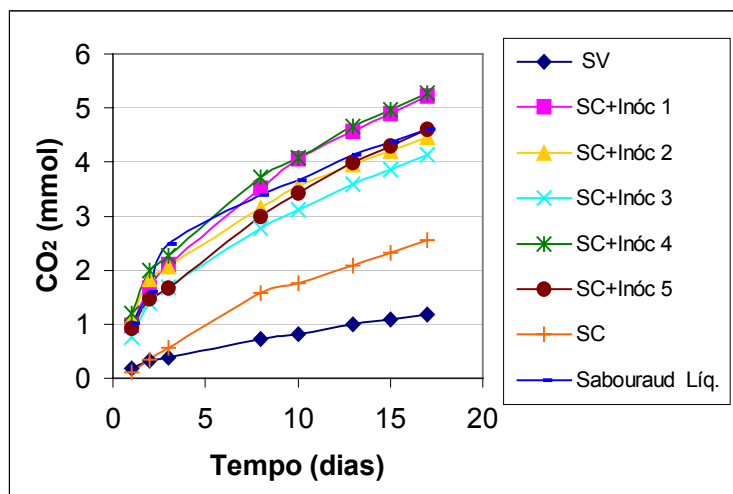


Figura 4. Quantificação do potencial degradador das espécies por meio do acompanhamento da produção de CO<sub>2</sub>. Onde SV= solo virgem, SC= solo contaminado.

Embora o resultado seja ainda incipiente, por conta do pouco tempo (17 dias) de monitoramento, pode-se observar que os microrganismos identificados como 1 e 4 se mostraram com uma capacidade ligeiramente superior à das outras culturas. Sendo que se compararmos esse resultado ao obtido com o solo contaminado, percebe-se que a biomassa fúngica traz um benefício duas vezes maior ao processo de remediação.

Os resultados obtidos no presente estudo nos mostram que é possível encontrar linhagens com potencial para degradação de petróleo, mesmo num solo que ainda não foi contaminado, podendo, claro, não ser essas espécies as dominantes no ambiente. No entanto, se por acaso um derramamento acontecer no local serão esses microrganismos os que irão predominar na microbiota nativa, por conta da seleção natural, graças à sua habilidade em assimilar hidrocarbonetos de petróleo.

## 5. Conclusão

Do experimento de isolamento de fungos filamentosos foram obtidos 50 microrganismos, dos quais 25 foram apontados como agentes de degradação.

Dentre os fungos avaliados em kitasato foi possível apontar os microrganismos 1 e 4 como os que possuem um maior potencial de degradação de óleo cru.

## 6. Agradecimentos

Agradeço ao Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica – PIBIC/CNPq – pela bolsa concedida e a todos do Centro de Tecnologia Mineral que cooperaram na execução deste trabalho.

## **7. Referências Bibliográficas**

ALEF, K. & NANNIPIERI, P. Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, London, 565pg. 1995.

LEMOS, J. L. S. Emprego de fungos no tratamento de solos contaminados com petróleo - Revisão bibliográfica. Relatório técnico parcial elaborado para o CETEM/MCT. Biblioteca do Centro de Tecnologia Mineral – CETEM, RT2001-51-00. 2001.

OLIVEIRA, M. C. D. (2002). Disponível em: <<http://www.cetesb.gov.br>>. Acesso em: março de 2002.

SANTOS, R. L. C. dos; RIZZO, A. C. de L.; LEMOS, J. L. S.; MILLIOLI, V. S.; CUNHA, C. D.; LEITE, S. G. Fa. Emprego de biorreatores não convencionais no tratamento de solos argilosos contaminados por petróleo 3. Relatório interno do projeto CETEM 2919 entregue ao CENPES/PETROBRÁS (Confidencial). Biblioteca do Centro de Tecnologia Mineral – CETEM, RI2002-022-00. 2002.