

ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DO SOLO BIORREMEIADORES DE DERIVADOS DE PETRÓLEO

GONÇALVES, Érica Bastos Corrêa ¹

NEGRI, Bárbara França ²

CAMPOLINO, Mariana Lourenço³

RESUMO

O petróleo é um combustível fóssil que apresenta grande potencial energético e grande parte da produção de energia é baseada nesse combustível. Entretanto, sua exploração e produção industrial acarretam graves impactos ambientais, que comprometem a qualidade do solo, do ar e das águas. Para mitigar tal agravo a biorremediação surge como uma tecnologia inovadora e menos dispendiosa que consiste na utilização de microrganismos que são capazes de metabolizar os contaminantes presentes nos solos transformando-os em substâncias de baixa ou nenhuma toxicidade. O objetivo deste trabalho foi isolar microrganismos com capacidade de degradação de hidrocarbonetos de petróleo (óleo e diesel), avaliando a taxa de biodegradação e a presença do gene *alkB* em amostras provenientes de solo. Foram coletadas duas amostras de solo em ambientes contrastantes (solo contaminado e solo não contaminado). Após a coleta foram isolados quatro microrganismos e nesses foram realizados testes de biodegradação, identificação do táxon e do gene *alkB*, e avaliação do perfil de digestão pela enzima de restrição *PstI*. Os quatro organismos foram classificados como bactérias, apresentaram potencial biodegradador independentemente da fonte de carbono (óleo, diesel, óleo+diesel) e apresentaram o gene *alkB*. No teste de biodegradação dois organismos obtiveram maior taxa de degradação, e perfis semelhantes de digestão enzimática, sugerindo uma relação entre a conservação da sequência do gene e o potencial degradador. Estudos complementares como a identificação dos microrganismos e sequenciamento dos fragmentos amplificados da região *alkB* poderão corroborar para o entendimento do processo de biodegradação.

Palavras-chave: Petróleo; hidrocarbonetos; microrganismos; biorremediação.

ABSTRACT

Oil is a fossil fuel that has great energy potential and a large part of energy production is based on this fuel. However, its exploitation and industrial production entail serious environmental impacts, which compromise the quality of the soil, air, and water. In order to mitigate such aggravation, bioremediation emerges as an innovative and less costly technology that consists in the use of microorganisms that are capable of metabolizing the contaminants present in soils transforming them into substances of low or no toxicity. The aim of this work was to isolate microorganisms with degradation capacity of oil hydrocarbons (oil and diesel), evaluating the biodegradation rate and the presence of the *alkB* gene in soil samples. Two soil samples were collected in contrasting environments (contaminated soil and uncontaminated soil). After collection, four microorganisms were isolated and biodegradation tests, identification of the taxon and the *alkB* gene, and evaluation of the digestion profile by the restriction enzyme *PstI* were performed. The four organisms were classified as bacteria, showed potential biodegradability independently of the source of carbon (oil, diesel, oil + diesel) and presented the *alkB* gene. In the biodegradation test, two organisms had higher degradation rate, and similar enzymatic digestion profiles, suggesting a relationship between the preservation of the gene sequence and the potential degradation. Complementary studies such as the identification of microorganisms and sequencing of amplified fragments of the *alkB* region may corroborate the understanding of the biodegradation process.

Keywords: Oil; hydrocarbons, microorganisms, bioremediation.

¹ Graduanda em Biotecnologia na Faculdade Ciências da Vida

² Doutora em Bioengenharia e Docente na Faculdade Ciências da Vida

³ Mestre em Biotecnologia e Docente na Faculdade Ciências da Vida

1 INTRODUÇÃO

O petróleo é um combustível fóssil que apresenta grande potencial energético e grande parte da produção de energia é baseada nesse combustível. Entretanto, a utilização do petróleo não apresenta apenas aspectos positivos, visto que sua exploração e produção industrial acarretam graves impactos ambientais, que comprometem a qualidade do solo, do ar e das águas (MARTINS *et al.*, 2014).

Atualmente as indústrias relacionadas com a exploração de petróleo e seus derivados estão entre as atividades que mais geram resíduos poluentes. Com as práticas inadequadas no manuseio, transporte e armazenamento destes produtos a contaminação ambiental tem crescido significativamente nas últimas décadas. Os derivados de petróleo são tóxicos à saúde humana e, estes resíduos, quando depositados no solo, podem ser absorvidos por animais e plantas. Diante deste cenário, surge a necessidade de desenvolvimento de técnicas para descontaminação das áreas afetadas (MARTINS *et al.*, 2014).

A biorremediação tem se destacado por ser uma tecnologia inovadora e menos dispendiosa que consiste na utilização de microrganismos que são capazes de metabolizar os contaminantes presentes nos solos transformando-os em substâncias de baixa ou nenhuma toxicidade. A caracterização do solo contaminado, a identificação da microbiota presente, e o controle de parâmetros tais como, teor de nutrientes, concentração e composição dos contaminantes, temperatura, *pH*, teor de umidade, são de extrema importância para o sucesso e eficiência da tecnologia de biorremediação (SANTOS *et al.*, 2007).

O isolamento e o cultivo microbiano provenientes de ambientes contaminados por derivados de petróleo têm apresentado uma grande variedade de organismos com capacidade de degradação de hidrocarbonetos de petróleo, enfatizando a diversidade e a abundância de genes envolvidos no processo de biodegradação de hidrocarbonetos (SETTE *et al.*, 2007; CÉBRON *et al.*, 2008).

Diante do exposto, a hipótese avaliada nesse trabalho foi se microrganismos encontrados no solo utilizam derivados de petróleo como fonte de carbono para produção de energia, tendo como objetivo principal isolar e identificar o táxon de microrganismos, avaliando a taxa de biodegradação e a

presença do gene *alkB* em amostras provenientes de solo não contaminado e contaminado com derivados de petróleo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PETRÓLEO

Apesar do grande avanço na produção de tecnologia sustentáveis, para geração de energia de fontes renováveis, é previsto, que o petróleo continue a ser a principal demanda energética mundial. (COSTA *et al.*, 2012; CHANDRA *et al.*, 2013). O petróleo em seu estado bruto presente sob a superfície terrestre é um líquido natural, oleoso e inflamável e é formado por uma mistura de milhares de substâncias orgânicas, principalmente hidrocarbonetos e alguns compostos orgânicos contendo oxigênio, hidrogênio, nitrogênio, enxofre e alguns metais (COSTA *et al.*, 2012; CHANDRA *et al.*, 2013). Os derivados de petróleo são obtidos a partir da destilação fracionada do óleo cru, onde os mesmos são submetidos a tratamentos para que sejam convertidas nos produtos finais, tais como o óleo diesel, a gasolina e o querosene (PUGAS *et al.*, 2015)

2.2 BIORREMEDIAÇÃO DO SOLO

A contaminação dos solos por petróleo e seus derivados pode ocorrer através do comprometimento na integridade dos tanques de estocagem, vazamentos em tubulações subterrâneas, que estão presentes nos postos de abastecimento ou nas refinarias de petróleo e em acidentes operacionais ocasionadas pelos transportes terrestres deste produto. Os contaminantes orgânicos derivados de petróleo são persistentes no solo, e infiltram rapidamente no solo e subsolo, afetando a atividade enzimática dos microrganismos, e reduzindo a quantidade de nutrientes do solo, deixando-os inférteis e inadequados para o plantio (BAEDECKER *et al.*, 2011).

Com o aumento das áreas afetadas pelo derramamento de petróleo, a contaminação por hidrocarbonetos torna-se uma grande preocupação ambiental, pois, esta substância interfere diretamente no ecossistema do solo contaminado. Diante dos registros, vem sendo desenvolvidas diversas técnicas físicas, químicas e biológicas visando a remoção de petróleo e seus derivados. Perante todas essas técnicas, a biorremediação vem se destacando como uma técnica

alternativa viável e promissora para o tratamento de áreas afetadas (BENTO *et al.*, 2003).

O processo de biorremediação é caracterizado pela utilização de microrganismos de ocorrência natural, ou seja, nativos do solo ou cultivados, para degradar ou remover os contaminantes através de atividades enzimáticas. Os hidrocarbonetos podem ser biodegradados completamente ou parcialmente, sendo que esse processo pode ocorrer em horas, dias ou meses (LEONEL *et al.*, 2010). A biodegradação de um poluente envolve etapas que utilizam enzimas e sequências de reações metabólicas, diferenciadas uma das outras. Geralmente para a biorremediação de solos são utilizados bactérias, fungos filamentosos e leveduras, sendo as bactérias as mais empregadas na descontaminação destas áreas. A tecnologia de biorremediação para o tratamento das áreas contaminadas pode ser aplicada de forma *in situ*, isto é, no próprio local onde ocorreu a contaminação ou *ex situ* onde se exige a remoção do solo contaminado de sua origem, para que o tratamento seja realizado em um local especializado (SOARES, 2006).

A biodegradação microbiana de poluentes de hidrocarbonetos de petróleo emprega as atividades catalíticas enzimáticas de microrganismos para aumentar a taxa de degradação de poluentes. No processo de biodegradação, os microrganismos obtêm energia ou assimilam os hidrocarbonetos de petróleo na biomassa celular. Desta forma, os microrganismos ganham energia e obtêm carbono durante a degradação do poluente, tornando a biodegradação um processo energeticamente favorável (LEONEL *et al.*, 2010).

A eficiência da biodegradação em solos contaminados depende do controle de condições ambientais que estimulam a atividade de biodegradação, dos hidrocarbonetos presentes no solo contaminado e da disponibilidade dos contaminantes para a flora bacteriana. Informações sobre a composição do contaminante e perfis enzimáticos dos microrganismos, também auxiliam na eficiência no processo (MAGOT *et al.*, 2000; SETTE *et al.*, 2007).

Os hidrocarbonetos são degradados em um consórcio microbiano onde estão presentes fungos e bactérias com atividades enzimáticas específicas na degradação, e transformação destes compostos em produtos comuns ao seu metabolismo, visando uma maior eficiência no processo, e redução no tempo de degradação destes resíduos (LEONEL *et al.*, 2010). As enzimas monoxigenases

e alcano hidroxilases estão envolvidos no processo de biodegradação aeróbia de hidrocarbonetos realizadas por bactérias (BOLL; HEIDER, 2010).

Os alcanos constituem entre 20% e 50% da composição do petróleo, sendo estes compostos são utilizados como fonte de carbono pelos microrganismos. A via de degradação mais descrita é a que utiliza um conjunto enzimático formado pelas enzimas *AlkB* (alcano hidroxilase), *AlkG* (rubredoxina) e *AlkT* (rubetoxina redutase). Estas enzimas são codificadas pelos genes *alkB*, *alkG* e *alkT*, que são encontrados principalmente nos filós *Actinobacteria* e *Proteobacteria*. O gene *alkB* é utilizado como marcador para a presença da via de degradação de alcanos em bactérias presente em solos contaminados ou em ambientes naturais, pois ele é responsável por codificar a enzima inicial na via de degradação do alcano (VAN BEILEN *et al.*, 2001). A utilização de métodos tradicionais dependentes de cultivo, associados as técnicas de PCR, permitem a observação dos aspectos genéticos e fisiológicos e fornecem resultados mais precisos na avaliação da diversidade de genes envolvidos no processo de biodegradação de hidrocarbonetos pelos microrganismos nos ambientes contaminados (CÉBRON *et al.*, 2008).

3 METODOLOGIA

As análises para concretização do objetivo proposto neste trabalho foram realizadas no laboratório da Faculdade Ciências da Vida em Sete Lagoas, Minas Gerais. Esse meio de pesquisa permite classificar este estudo como pesquisa experimental que tem a finalidade de determinar um objeto de estudo, selecionar as variáveis que seriam capazes de influenciá-lo e definir as formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz no objeto (MARCONI; LAKATOS *et al.*, 2003).

3.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram coletadas duas amostras de solo contendo 60g cada. Uma amostra foi coletada em uma refinaria de óleo, situada na região Paraopeba/MG e a outra amostra foi coletada em área rural localizada em Sete Lagoas/MG. As amostras foram acondicionadas em recipientes plásticos, e submetidas ao processo de enriquecimento para o isolamento de microrganismos alvo.

3.2. ENRIQUECIMENTO DA AMOSTRA

O experimento foi realizado em triplicatas, de maneira que as amostras foram inoculadas em meio de cultura mineral *Bushnell Haas* (BH), utilizando como fonte de carbono o óleo industrial, o óleo diesel comercial e a mistura do óleo industrial com o óleo diesel. Para isso, foram realizados três tratamentos diferenciados pela sua fonte de carbono, cada um deles continham as amostras de solo (3g), inicialmente adicionadas a 30mL do meio BH líquido contendo 1% da respectiva fonte de carbono (óleo industrial, óleo diesel e a mistura de óleo industrial e óleo diesel). As amostras foram incubadas a 25°C, durante 15 dias.

3.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO TÁXON DOS MICRORGANISMOS BIORREMEDIADORES DE DERIVADOS DE PETRÓLEO

Para o isolamento dos microrganismos, foram retiradas alíquotas de 5 mL do meio BH, incubadas nas condições descritas no item 3.2. As alíquotas foram cultivadas em meio BH sólido, suplementado com 1% de óleo industrial, 1% de óleo diesel e 1% da mistura de óleo industrial e óleo diesel do volume total pela técnica de incorporação. As colônias isoladas foram inoculadas em placas de Petri, contendo o meio sólido *Luria-Bertani* (LB). Após o período de incubação a 25°C por 5 dias, foram selecionados quatro microrganismos que obtiveram maior crescimento, e destas amostras foi extraído o DNA genômico utilizando o *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega), seguindo recomendações do fabricante. Para todas as amostras a concentração de DNA utilizada foi de 10ng/μL. Para a identificação taxonômica de bactérias, fragmentos do gene 16S rRNA foram amplificados utilizando o *primer* 968F: 5'-AACGGGAAGAACCTTAC-3' e 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT3'. A PCR constituiu de 2,5 μL de DNA (1 ng/ μL), 2,5 μL de cada primer a 5 mM, 6,25 μL de tampão de reação 10X, 3,12 μL de MgCl₂ (50 mM), 2,5 μL dos dNTPs (2,5 mM), 2,5 μL de Taq DNA polimerase (5 U/μL) (Invitrogen Paisley, UK) em volume final de 50 μL. A amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos, seguida de 25 ciclos a 94 °C por 45 segundos, anelamento dos *primers* a 55°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para a identificação taxonômica de fungos (região 28S) foi utilizado PCR a partir de reação com *primers* ITS 4: 5'- TCCTCCGGTTATTGATATGC- 3'e ITS

5 5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG -3'. A reação inicial constituiu de 2,5 µL de DNA (1 ng/ µL), 2,0 µL de cada *primer* a 5 mM, 6,25 µL de tampão de reação 10 X, 2,5 mM de MgCl₂, 2,5 µL dos dNTPs (2,5mM), 0,5 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) (*Invitrogen Paisley, UK*), 10 µL de solução de betaína (5 M), num volume total de 50 µL. Uma alíquota de 5 µL dos produtos de PCR foi corada com *Gel Red (Biotium, Hayward, Califórnia, USA)*, e submetida a eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando-se como marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (*Life Technologies, USA*). A visualização do DNA amplificado foi realizada em transiluminador sob luz ultravioleta e fotografada no equipamento L-PIX Image EX (Loccus Biotecnologia - Loccus do Brasil, Cotia, SP, Brasil).

3.4 TESTE DE BIODEGRADAÇÃO

Os testes executados nesta etapa foram baseados na utilização do indicador *redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP)*. O princípio básico deste teste consiste na detecção da oxidação da fonte de carbono fornecida aos microrganismos, que durante o processo de metabolização oxidam o hidrocarboneto e os elétrons que são liberados e transferidos aos aceptores como oxigênio, nitrato ou sulfato (MORAIS, 2005). O indicador redox DCPIP quando adicionado ao meio de cultura *Bushnell-Hass (BH)* (DIFCO,1984), é capaz de confirmar a atividade degradadora dos microrganismos sobre a fonte de carbono através da mudança de cor do DCPIP de azul (estado oxidado) para o incolor (estado reduzido).

Para a realização do experimento, 200µL de suspensão microbiana, padronizada em 10⁸UFC/mL, foram adicionadas às microplacas, contendo 2000µL de meio BH, 80µL da fonte de carbono (óleo industrial, óleo diesel, mistura de óleo industrial a óleo diesel) e 40µL do indicador *redox DCPIP*. Poços abióticos, contendo 200µL de água estéril, substituindo a suspensão microbiana, foram utilizados como controle negativo. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas. Após a descoloração, retirou-se uma alíquota de 2 mL da suspensão e centrifugou-se por 3 minutos para decantação da matéria sólida. O líquido metabólico resultante foi submetido a análise de absorvância em espectrofotômetro a $\lambda = 604$ nm. O cálculo utilizado para estimar a taxa de biodegradação foi baseado no quanto a absorvância média das triplicatas da amostra reduziu com relação ao respectivo controle respectivo de cada

tratamento, este dependendo da fonte de carbono, óleo industrial, óleo diesel e mistura de óleo industrial com óleo diesel. Para avaliar a taxa de biodegradação foi realizado uma análise de variância e o teste de *Tukey* $p < 0,05$ pelo *software* R 3.1.1

3.5 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE *alkB* DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Para a identificação do gene *alkB2* foi utilizado PCR a partir de reação positiva do item 3.3 com os oligonucleotídeos *alkBF* 4: 5'-CCTGCTCCCGATCCTCGA - 3' e *alkBR* 5'-TCGTACCGCCCGCTGTCCAG -3'. A reação de PCR constituiu-se de 2,5 ng de DNA, cada oligonucleotídeo a 0,25 mM, tampão de reação 1X, MgCl₂ 3,12 mM, dNTPs 0,125 mM cada, 1,25 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Paisley, UK) em um volume final de 20 µL. A amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 94 °C durante 3 minutos, seguida de 25 ciclos a 94 °C por 45 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos a 59 °C por 45 segundos, extensão a 72 °C por 2 minutos e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os fragmentos amplificados da região *alkB* foram digeridos com a enzima de restrição *Pst*I (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. A sequência alvo desta enzima é "GTGCAG", sendo a clivagem entre a guanosina e a adenina, dessa forma, após a ação desta enzima, espera-se obter fragmentos de DNA com 265pb e 452pb. Uma alíquota de 2 µL dos produtos de PCR e da digestão foram coradas com Gel Red (Biotium, Hayward, Califórnia, USA) e submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando-se como marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies, USA). A visualização do DNA amplificado e digerido foi realizada em transiluminador sob luz ultravioleta e fotografada no equipamento L-PIX Image EX (Loccus Biotecnologia - Loccus do Brasil, Cotia, SP, Brasil).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram coletadas duas amostras de solo sendo uma proveniente de solo contaminado coletada em uma área dentro de uma refinaria de óleo (figura 1 A),

e a outra proveniente de um solo não contaminado coletado em uma área rural (figura 1 B) localizada a 21,5 km da refinaria onde foi coletado a outra amostra.



Figura 1: Áreas onde foram coletadas as amostras de solo representadas pela seta vermelha, (A) solo contaminado coletado dentro da refinaria de óleo, (B) solo não contaminado coletado em zona rural.

Solos contaminados por petróleo tem demonstrado uma maior variedade de microrganismos com capacidade de degradação dos hidrocarbonetos, pois os contaminantes auxiliam na seleção de linhagens e no desenvolvimento de adaptações que favorecem na habilidade de biorremediação(MAGOT *et al.*, 2000; SETTE *et al.*, 2007).

4.2 ENRIQUECIMENTO DA AMOSTRA

Para o cultivo dos microrganismos foram realizados três tratamentos com fontes de carbono distintas para cada um deles como pode ser observado na figura 2. As amostras de solo contaminado e solo não contaminado coletadas no tratamento 1 foram inoculadas em meio de cultura BH liquido enriquecido com 1% de óleo, no tratamento 2 foram inoculadas com 1% de diesel e no tratamento 3 foram inoculadas com 1% de óleo + diesel, para cada tratamento foi realizado um controle negativo do meio de cultura com as respectivas fontes de carbono. As análises foram realizadas em triplicatas totalizando 21 amostras.

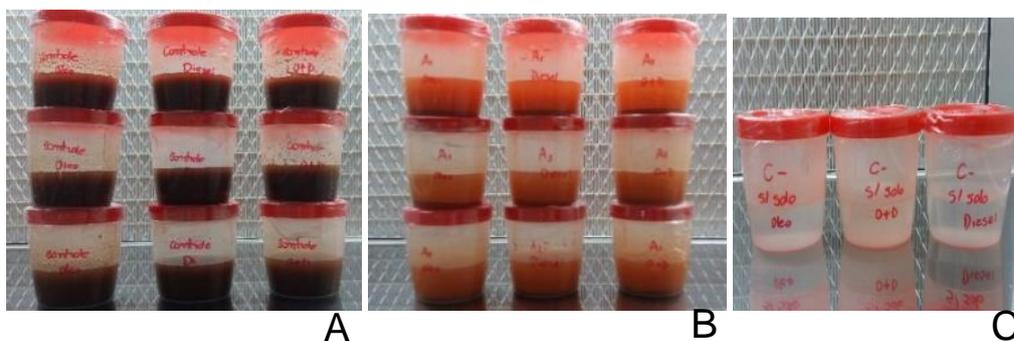


Figura 2: Cultivo dos microrganismos isolados de solo não contaminado(A), solo contaminado(B), Controle negativo(C) em meio de cultura BH enriquecido com as devidas fontes de carbono.

4.3 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS BIORREMEDIADORES DE DERIVADOS DE PETRÓLEO

As colônias isoladas em meio BH sólido foram inoculadas em placas de Petri, contendo o meio sólido LB; Após o período de incubação a 25°C por 5 dias foram selecionados quatro microrganismos que obtiveram maior crescimento. Os quatro microrganismos selecionados foram cultivados em diferentes tratamentos, M1 amostra de solo contaminado proveniente do tratamento 3, M2 amostra proveniente de solo contaminado do tratamento1, M3 amostra de solo não contaminado do tratamento 2 e M4 amostra de solo contaminado do tratamento 2.

Para a identificação do táxon, os microrganismos selecionados foram caracterizados a partir do seu DNA genômico por PCR das regiões ribossomais 16S e 28S por iniciadores específicos. A identificação de microrganismos pode ser avaliada através de uma região conservada do seu genoma (16S e 28S). O gene 16S rRNA, codifica para a subunidade ribossômica menor que é parte do sítio de ocorrência da síntese proteica e, portanto, está presente em todas as bactérias. (ATLAS e BARTHA, 1998). O gene 28 rDNA é uma região importante para avaliação das diferentes formas dos fungos (BRUNS *et al.*, 1991). O resultado da PCR está representado na figura 3, onde pode-se observar que para as quatro culturas isoladas as bandas que apresentaram uma maior intensidade estão próximas a região da banda de controle positivo com aproximadamente 454 pb e que os *primers* se anelaram perfeitamente ao DNA bacteriano, descartando a possibilidade da presença de fungo dentre os microrganismos isolados.

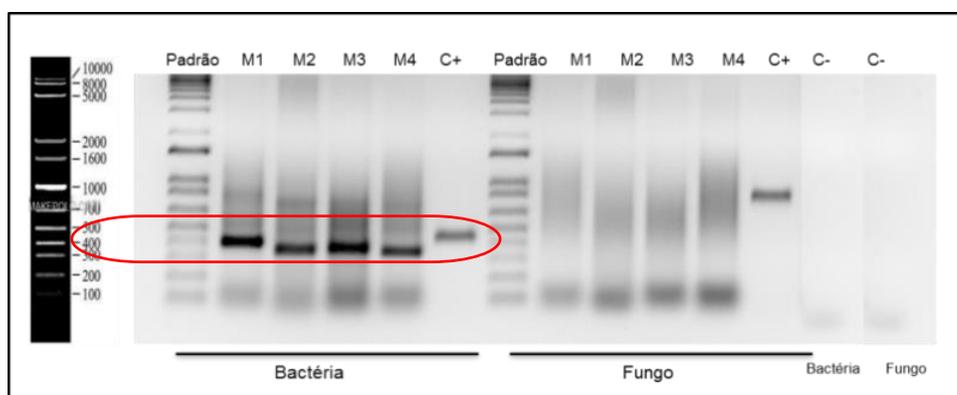


Figura 3: PCR da região 16S rDNA (bactéria) e região 28S rDNA (fungo) dos quatro microrganismos selecionados (M1, M2, M3 e M4) visualizado em gel de agarose 1%. C+: controle positivo, C-: controle negativo.

A escassez de fungos pode ser explicada pela profundidade da amostra coletada. A biodiversidade dos fungos é predominante nos primeiros cinco centímetros de camada de solo, isto é, à medida que aumenta a profundidade do solo, há um decréscimo destes microrganismos e conseqüentemente há um aumento na comunidade de bactérias, podendo ser explicado em virtude da variação da umidade e porosidade do solo (RON, E. Z.; ROSENBERG *et al.*,2014).

4.4 TESTE DE BIODEGRADAÇÃO

A apresentação dos resultados dos testes utilizando o meio BH e o indicador *redox* DCPIP baseou-se no cálculo da diminuição média da absorbância das triplicatas da amostra em relação ao controle, sendo o resultado final dado em porcentagem de biodegradação.

A partir dos dados obtidos pelo teste de biodegradação foi realizado uma análise de variância em um delineamento fatorial, onde o primeiro fator foi a fonte de carbono (óleo, diesel e óleo + diesel) e o segundo os quatro microrganismos e o controle. Pela ANOVA foi verificado que apenas o tipo de microrganismo teve significância no processo de biodegradação, sendo a fonte de carbono indiferente no processo.

Na figura 4 (A) podemos observar que além das características físico-químicas do próprio contaminante, a eficiência da biodegradação está relacionada diretamente com local onde o composto se encontra inserido como poluente (NCR, 1994). É possível perceber, conforme figura 4(B) que os microrganismos M1 e M4 obtiveram maior taxa de biodegradação. Esse perfil semelhante de degradação dos microrganismos M1 e M4 pode estar relacionado ao local de isolamento dos mesmos. Microrganismos isolados em área contaminada indica que possivelmente eles são capazes de metabolizar as espécies químicas existentes, diminuindo assim a concentração dos contaminantes presentes no meio. O aumento na capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos por populações de microrganismos que habitam ambientes poluídos por derivados de petróleo é chamado de adaptação. (LEAHY; COLWELL *et al.*,1990).

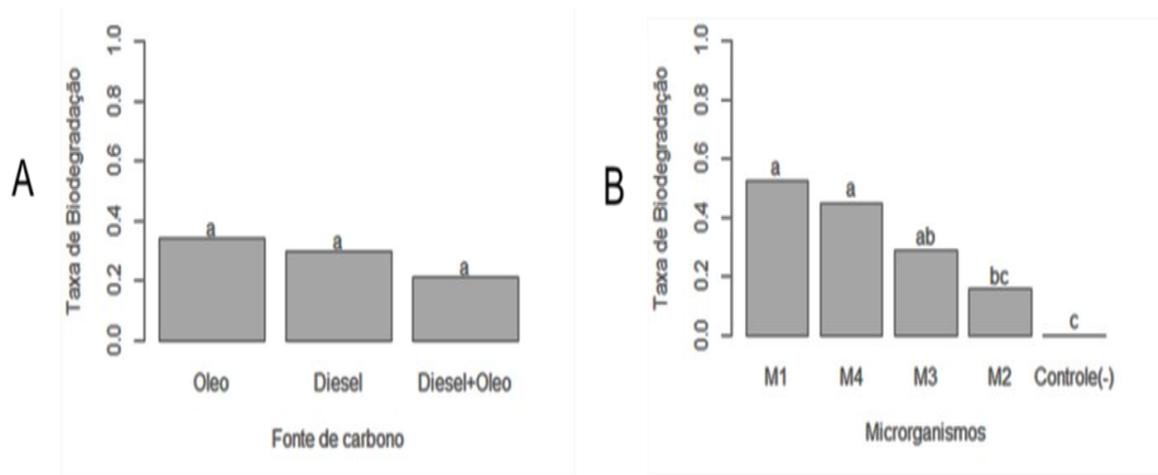


Figura 4 (A): Análise da taxa de biodegradação das três fontes de carbono avaliadas (Óleo, diesel e diesel+óleo: teste de *Tukey* ($p < 0,05$)). (B): Análise da taxa de biodegradação dos quatro microrganismos avaliados (M1, M2, M3 e M4), teste de *Tukey*. Letras iguais significam que os microrganismos obtiveram estatisticamente a mesma taxa de biodegradação, $p < 0,05$.

Existem mecanismos que podem contribuir para esta adaptação destes microrganismos, como a indução e repressão de enzimas específicas que ocorre quando na presença de algum substrato. Os genes que induzem a formação de alguma enzima são reprimidos, liberando a síntese desta enzima, que por sua vez podem liberar substâncias como biossurfactantes no meio aumentando a biodisponibilidade do contaminante e facilitando o crescimento de bactérias. As mudanças genéticas desses microrganismos que estão em contato direto com o contaminante resultam em novas atividades metabólicas, o enriquecimento seletivo de organismos auxiliam na capacidade de transformação dos compostos, aumentando a taxa de biorremediação. (LEAHY; COLWELL *et al.*, 1990).

Em condições aeróbias, muitos hidrocarbonetos derivados de petróleo podem ser facilmente biodegradados. Óleos de baixa densidade contêm em grande maioria hidrocarbonetos de moléculas simples e de baixo peso molecular, que são metabolizados por microrganismos degradadores. Óleos com densidades maiores possuem hidrocarbonetos de moléculas maiores e com maior peso molecular, que são mais resistentes. Bactérias degradadoras em meio aeróbio são capazes de converter completamente os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) que são substâncias tóxicas e de difícil remoção do ambiente contaminado, em dióxido de carbono e água, por meio da ação de enzimas dioxigenases (OLIVEIRA; MANFIO, 2006).

4.5 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Atualmente, genes com potencial de degradação de alcanos foram identificados em um pequeno número de bactérias, como *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Proteobacter*. A alcano monooxigenase é o principal complexo enzimático que desempenha um papel importante na degradação do alcano bacteriano, este é composto pela enzima monooxigenase de ferro não-heme ligada a membrana que é codificada pelo gene *alkB*. Para identificação do gene *alkB* nos quatro microrganismo isolados, foi realizada uma PCR com iniciadores específicos para os nucleotídeos da região conservada do *alkB2*. Cada monooxigenase alcano é específico para uma certa diversidade de alcanos, e a região *alkB2* é parcialmente responsável pela oxidação inicial na cascata de degradação (WHYTE *et al.*, 2002).

A figura 5 A mostra que a partir da amplificação do material genético dos quatro microrganismos isolados (M1, M2, M3, M4), todos apresentaram fragmentos de 717 pb, confirmando a presença do gene *alkB* em seu DNA. As alcano 1-monooxigenases (*AlkB*), são enzimas de ferro não heme que estão presentes integralmente na membrana das bactérias e são responsáveis por catalisar a primeira reação de adição de oxigênio em alcanos. Além disso, são biocatalisadores versáteis que realizam uma ampla gama de reações de oxidação. A *AlkB* atua em conjunto com outras duas proteínas, rubredoxina e rubredoxina redutase. Esse processo é chamado de sistema alcano hidroxilase e permite que várias bactérias consigam crescer em ambientes contaminados por alcanos. Por ser o gene responsável por codificar a enzima inicial atuante na via de degradação, o gene *AlkB* é utilizado como marcador para a presença de bactérias com capacidade de degradar alcanos (HEISS BLANQUET *et al.*, 2005; VAN BEILEN; FUNHOLFF, 2007).

Foi realizada uma digestão enzimática com a enzima de restrição *PstI* dos fragmentos de DNA amplificados para o gene *alkB*, onde a enzima age clivando o DNA, formando duas regiões de aproximadamente 265 pb e 452 pb. A partir da digestão enzimática, pode ser observado conforme a figura 5 B que os microrganismos M1 e M4 tem perfis eletroforeticos semelhantes, podendo refletir na semelhança do perfil de degradação destes microrganismos, diferentemente dos M2 e M3.

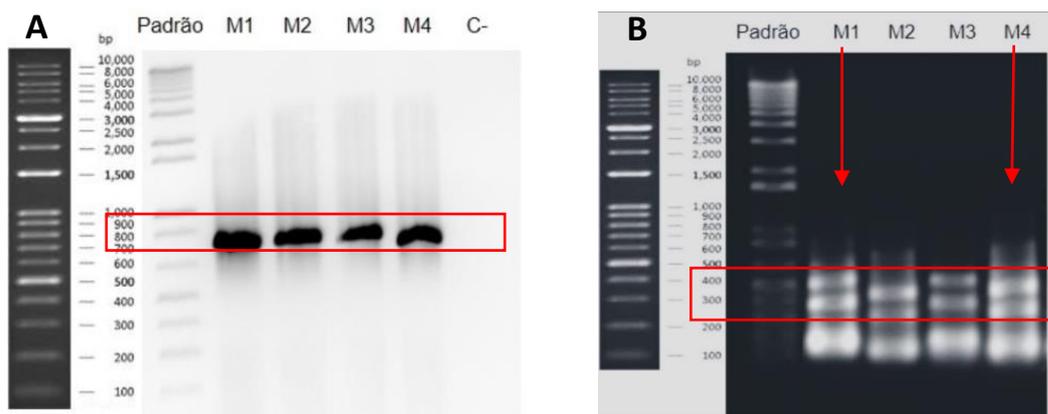


Figura 5 (A): PCR da região amplificada para o gene *alkB2* dos quatro microrganismos selecionados (M1, M2, M3 e M4) visualizado em gel de agarose 1%. C-: controle negativo. (B): Digestão enzimática pela enzima *PstI* do fragmento amplificado gene *alkB2* dos quatro microrganismos selecionados (M1, M2, M3 e M4) visualizado em gel de agarose 1%.

A semelhança do perfil de degradação dos microrganismos M1 e M4 pode estar associada a sequência do DNA genômico amplificada, que provem de uma região conservada dos microrganismos, o que caracteriza estes microrganismos M1 e M4 com melhor perfil de biorremediação dentre os quatro isolados. (WHYTE *et al.*, 2002).

5 CONCLUSÃO

Quatro microrganismos isolados e identificados como bactérias mostraram potencial de degradação de hidrocarbonetos, além da presença do gene *alkB* em seu DNA genômico. Os microrganismos M1 e M4, que apresentaram melhor perfil de degradação, também apresentaram perfis eletroforeticos semelhantes. Estudos complementares, como a identificação dos microrganismos e sequenciamento dos fragmentos amplificados da região *alkB* poderão corroborar para o entendimento do processo de degradação. O estudo e a utilização de microrganismos selecionados em solos naturais e principalmente em áreas já contaminadas por hidrocarbonetos representam uma estratégia importante para a biorremediação destas áreas. Para que a biorremediação reflita em resultados satisfatórios, é fundamental o conhecimento do princípio e das técnicas utilizadas. Isso auxilia na utilização e seleção correta do microrganismo de acordo com as condições de cada área e de cada contaminante presente.

6 REFERÊNCIAS

- ATLAS, R. M. and BARTHA, R. 1998. **Microbial ecology: Fundamentals and Applications**. Benjamin / Cummings Publishing Company. p. 281-324.
- BAEDECKER, M. J. *et al.* Loss of volatile hydrocarbons from an LNAPL oil source. **Journal of Contaminant Hydrology**, Bemidji, v. 126, n. 3–4, p. 140-152, 2011.
- BENTO, F. M. *et al.* Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n. 22, p. 65-68, 2003.
- BOLL, M., e HEIDER, J. (2010) Anaerobic degradation of hydrocarbons: mechanisms of C-HBond activation in the absence of oxygen. In: **Handbook of hydrocarbon and lipid Microbiology**. Timmis K. N. (ed.). Berlin Heidelberg. Springer-Verlag, 1012-1024
- BRUNS T, White T, Taylor J. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**. 1991: p. 525-564.
- CÉBRON, A. *et al.* Real-time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHDa) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. **J. Microbiol. Methods** 73, 148-159, 2008.
- CHANDRA, S. *et al.* Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. **Annals of Microbiology, Milano**, v. 63, n. 2, p. 417-431, 2013.
- COSTA, A. S. *et al.* Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 105, n. 5, p. 31-39, 2012.
- HEISS-BLANQUET, S.; Benoit, Y.; Marechaux, C.; Monot, F. (2005) Assessing the role of alkane hydroxylase genotypes in environmental samples by competitive PCR. **Journal Applied Microbiology** 99: 1392–1403.
- LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. **Microbiol. Rev.** 1990, 54, 305.
- LEONEL, L. V.; NASCIMENTO, E. G.; BERTOZZI, J.; VILAS BÔAS, L. A.; VILAS BÔAS, G. T. Biorremediação do solo. **Terra e cultura** – n. 51, Julho a Dezembro, 2010.
- MAGOT, M., Ollivier, B., Patel, B. K. C. (2000) Microbiology of petroleum reservoirs. **Antonie Van Leeuwenhoek** 77: 103–116.
- MARCONI, M. A.; LAKATOS, E. M. Fundamentos de metodologia científica. 5. ed. São Paulo: **Atlas** 2003, 312 p.
- MARTINS, S. S. S. *et al.* Produção de petróleo e impactos ambientais: algumas considerações. 2014. 23 p. Artigo científico (Diretoria Acadêmica de Recursos Naturais)- Instituto Federal do Rio Grande do Norte, **HOLOS**.

MORAIS, E. Biodegradação de resíduos oleosos provenientes de refinaria de petróleo através do sistema de biopilhas. 2005. 73 f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Geociências e Meio Ambiente – Mestrado e Doutorado) - Instituto de Geociências e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

NRC (National Research Council). Alternatives for Ground Water Cleanup. **National Academy** Press, Washington, D.C. 1994.

OLIVEIRA, V. M., MANFIO, G.P. Molecular approaches for the screening of novel enzymes. In: **Jean-Louis Reymond. (Ed.)**. Enzyme Assays: High-throughput screening, genetic selection and fingerprinting. p. 221-238, 2006.

PUGAS, M. S. Efeitos secundários resultantes da aplicação de métodos oxidativos para degradação de contaminantes orgânicos em solos. 2015. 125 f. Tese (Doutorado em Recursos Minerais e Hidrogeologia)- Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo USP, São Paulo, 2015

RODRIGUES, G. M. A. Atividade de armazenamento e distribuição de combustível nos centros urbanos: os postos de combustíveis e a saúde pública. 2015. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo- USP, São Paulo, 2015.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 27, n. 24, p. 191-194, 2014.

SANTOS, Renata da Matta *et al.*, Remediação de solo contaminado por petróleo em biopilhas- Escala Piloto. 2007. 10 p. Artigo científico (4º PDPETRO, Campinas, SP)- Escola de Química/UFRJ.

SETTE, L. D.; SIMIONI, K. C.; VASCONCELLOS, S. P.; DUSSAN, L. J.; NETO, E. V.; OLIVEIRA, V. M. Analysis of the composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. **Antonie Van Leeuwenhoek**. 2006

SOARES, M. Aplicação da biofiltração no tratamento de vapores de gasolina. 2006. 207f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos - área de concentração de saúde) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2006.

Van Beilen, J. B., e Funhoff, E. G. (2007) Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology** 74:13–21.

Van Beilen, J. B.; Panke, S; Lucchini, S.; Franchini, A. G.; thlisberger, M. R.; Witholt, B. (2001) Analysis of Pseudomonas putida alkanedegradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes. **Microbiology** 147: 1621–1630.

Whyte, L. G.; Smits, T. H.; Labbé, D.; Witholt, B.; Greer, C. W.; van Beilen, J. B. (2002) Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(12): 5933-5942