

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS HALOTOLERANTES COM ATIVIDADE HIDROCARBONOCLÁSTICA A PARTIR DE ÁGUA PRODUZIDA DE PETRÓLEO

ISOLATION OF HALOTOLERANT BACTERIA WITH HYDROCARBONOCLASTIC ACTIVITY FROM OIL PRODUCED WATER

Wilmar Alirio Botello Suárez⁽¹⁾
Miguel Angel Molano Hernández⁽²⁾
Elkin Fernando Rodas Mendoza⁽³⁾
Elwy Guillermo Machado Sierra⁽⁴⁾

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar bactérias halotolerantes com potencial na degradação de hidrocarbonetos. Os isolados bacterianos foram obtidos a partir de amostras de água produzida de petróleo, e posteriormente foi determinada a sua tolerância a diferentes concentrações de salinidade, na faixa de 0 a 15% de NaCl. Seguidamente, os isolados que apresentaram maior halotolerância foram caracterizados a nível molecular, e avaliados em função de seu potencial na degradação de hidrocarbonetos. Para isso, foram estabelecidos cultivos em meio mínimo suplementado com óleo diesel, sob condições de baixa e alta salinidade. Foram obtidos dois isolados bacterianos tolerantes a uma concentração de 10% de NaCl (HC1 e HC5). A análise comparativa de sequencias parciais do gene que codifica para o *16S rRNA*, demonstrou que os isolados apresentaram alta similaridade com os gêneros *Micrococcus sp.* e *Staphylococcus sp.*, mostrando relação com micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos. A atividade hidrocarbonoclástica em condições salinas, foi corroborada ao observar uma remoção de óleo diesel de 79% e 81% para HC1 e HC5, respectivamente, após 96 h de incubação a 30°C. Conclui-se que estes isolados podem ser efetivos na biodegradação de hidrocarbonetos, e apresentam potencial para o desenvolvimento de estudos de processos de bioaugmentação em sistemas de tratamento biológico de água produzida de petróleo.

Palavras-chave: Halotolerância. Bioaugmentação. Potencial hidrocarbonoclástico.

Abstract

The aim of the present study was to isolate and characterize halotolerant bacteria with hydrocarbonoclastic potential. Bacterial isolates were obtained from oil produced water samples, and subsequently its tolerance to different salinity concentrations, in the range of 0

¹Doutorando em Microbiologia Agropecuária pela UNESP. Endereço eletrônico: wbotello@unisangil.edu.co.

²Engenheiro Ambiental pela Fundación Universitaria de San Gil (Yopal, Colômbia). Endereço eletrônico: miguelmolano@unisangil.edu.co.

³Doutorando em Microbiologia Agropecuária pela UNESP. Endereço eletrônico: elferodas@yahoo.es.

⁴Doutorando em Microbiologia Agropecuária pela UNESP. Endereço eletrônico: elwimachado@gmail.com.

to 15% NaCl, was determined. Afterwards, the isolates that showed the highest halotolerance were characterized at the molecular level, and evaluated to determine their potential for hydrocarbon degradation. Cultures were established on minimal medium supplemented with diesel oil, at low and high salt concentration. Two isolates (HC1 and HC5), tolerant at 10% of NaCl were obtained. Comparative analysis of partial sequences of the gene coding for 16S rRNA, showed that isolates presented high similarity with the genera *Micrococcus* sp. and *Staphylococcus* sp., exhibiting relationship with hydrocarbons degrading microorganisms. The hydrocarbonoclastic activity in saline conditions was confirmed by diesel oil removal, 79% and 81% for HC1 and HC5, respectively, after 96 h of incubation at 30°C. It is concluded that these isolates may be effective in hydrocarbons biodegradation, and have potential for the development of studies for bioaugmentation processes in biological treatment systems of oil produced water.

Keywords: Halotolerance. Bioaugmentation. Hydrocarbonoclastic potential.

1. Introdução

Os processos relacionados com a produção de petróleo geram grandes quantidades de resíduos líquidos, os quais apresentam alta concentração de cloretos, hidrocarbonetos e matéria orgânica (FAKHRU'L-RAZI et al., 2009). As estratégias empregadas para o tratamento e disposição final destes efluentes, denominados como águas produzidas de petróleo (APP), usualmente envolvem o uso de sistemas *ex-situ*, nos quais são requeridas operações tecnologicamente sofisticadas, que buscam reduzir o seu potencial contaminante a níveis aceitáveis pela legislação ambiental, e possam ser reutilizadas ou dispostas sem risco de impacto nos ecossistemas. A atividade hidrocarbonoclástica, definida como a faculdade de diversos grupos bacterianos para fraccionar hidrocarbonetos de maneira sintrófica, pode ser aproveitada para reduzir a concentração deste tipo de compostos das APP (HII et al., 2009). No entanto, a elevada presença de sais nestes efluentes, faz necessário que isolados selecionados para esta alternativa também sejam halotolerantes. Assim, é de particular interesse reconhecer essa atividade em isolados bacterianos recuperados associados a APP, os quais, posteriormente possam ser aproveitados em processos de bioaugmentação.

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi realizar o isolamento e caracterização de bactérias halotolerantes a partir de APP, e avaliar o sua atividade hidrocarbonoclástica, com a finalidade de evidenciar o potencial destes isolados para serem aplicados em processos de tratamento biológico da água produzida em operações petroleiras.

2. Material e Métodos

O isolamento bacteriano foi feito a partir de amostras de APP, coletadas em tanques de armazenamento deste resíduo, mediante estabelecimento de diluições seriadas e cultivo sobre

placas contendo ágar *Luria Bertani* (LB, 30°C por 72h). As colônias geradas foram isoladas e selecionadas em função a suas diferenças morfológicas. A determinação da halotolerância foi realizada através do teste de tolerância salina, modificado de Shihora, 2013, e os isolados que apresentaram maior halotolerância foram caracterizados a nível molecular mediante amplificação e sequenciamento dos genes *16S rRNA* correspondentes. Para relacionar grupos taxonômicos específicos, as sequências nucleotídicas obtidas foram comparadas usando o programa *BlastN*. Sequências relacionadas, correspondentes a bactérias com atividade hidrocarbonoclástica, foram recuperadas da base de dados SILVA (QUAST et al., 2013) e alinhadas com *ClustalW*. Posteriormente, foi gerada uma árvore mediante o algoritmo *Neighbor- Joining*. Aliás, com a finalidade de estabelecer a atividade hidrocarbonoclástica, os isolados selecionados foram cultivados por 10-12 h em caldo LB e posteriormente, foram inoculados ao 5 % em 100 ml de meio mínimo, composição (mM): (NH₄)₂SO₄ 10,0; MgSO₄ 5,0, CaCl₂ 1,0; KH₂PO₄ 0,8; K₂HPO₄ 0,16; FeSO₄ 10,0 μ M e casaminoácidos 0,03%, contendo óleo diesel (0,2%), em condições de baixa e alta salinidade (0,1% e 10% de NaCl, respectivamente). O experimento foi realizado em duplicata, e foram estabelecidos controles sem a incorporação de óleo diesel ao meio. As culturas foram incubadas a 30°C por 96 h, tempo depois do qual foi determinada a concentração de óleo residual pelo método gravimétrico, como descrito por Aboelwafa e Alwasify (2009).

3. Resultados e Discussão

Seleção de isolados bacterianos. Foram obtidos um total de cinco isolados bacterianos com características morfológicas distintas, os quais foram avaliados com a finalidade de estimar seu nível de halotolerância (Tabela 1).

Tabela 1 - Características morfológicas e halotolerância dos isolados obtidos

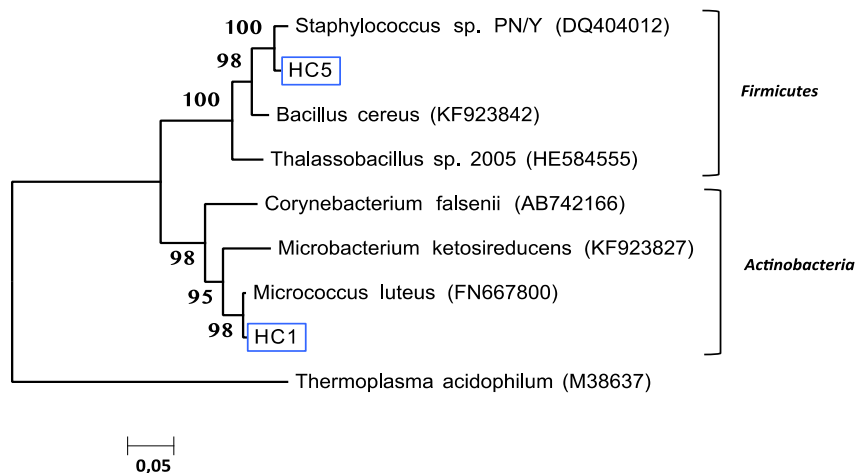
Característica	Isolado				
	HC1	HC2	HC3	HC4	HC5
Diâmetro da colônia (mm)	5	7	3	4	12
Morfologia da colônia	C,E,A,Cx	C,E,B,Cx	C,I,N,R,Cx	C,I,N,Cx	C,I,B,P
Gram	+	+	-	-	+
Halotolerância (% NaCl)	10,0	6,0	3,0	3,0	10,0

^a Morfologia da colônia em meio LB: C: Circular; E/I: Borde inteiro/irregular; A: Amarela, B: Branca, R: Rosa, N: Laranja; Cx/P: Convexa/Plana.

Para as análises posteriores foram empregados os isolados HC1 e HC5, pois apresentaram níveis de halotolerância superiores (10%).

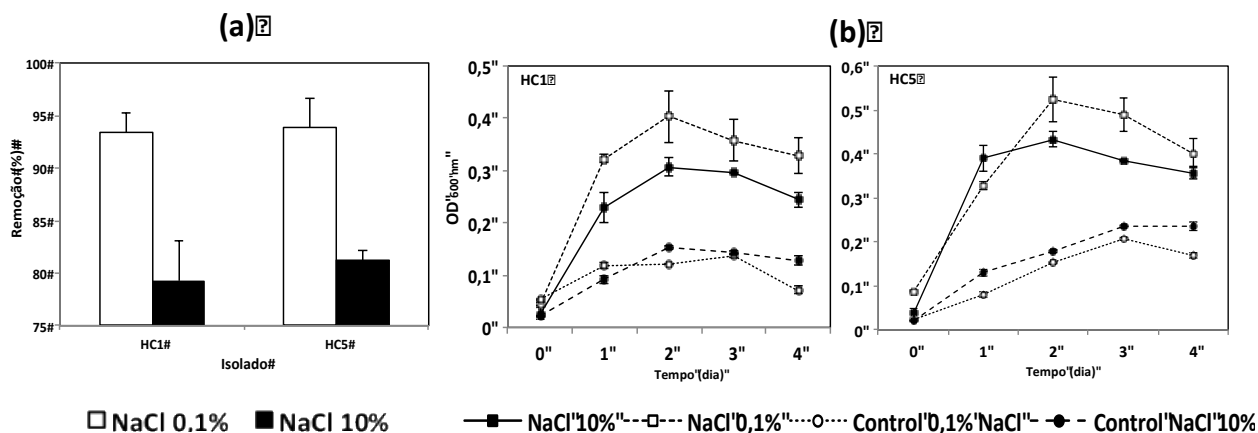
Caracterização molecular. A análise comparativa das sequências obtidas permitiu relacionar ao isolado HC1 com *Micrococcus sp.* e o isolado HC5 com *Staphylococcus sp.*, com uma identidade de 99,3 e 97,5 %, respectivamente. Ao comparar as sequências do gene *16S rRNA* com algumas sequências de bactérias relacionadas com atividade hidrocarbonoclástica, foi gerada a árvore apresentada na Figura 1.

Figura 1 - Árvore gerada pelo método de *Neighbor Joining* de sequências parciais de genes *16S rRNA* dos isolados HC1 e HC5 (quadrados azuis). São relacionadas sequências de bactérias com atividade hidrocarbonoclástica. A árvore foi enraizada à sequência da arqueia *Thermoplasma acidophilum*. *Bootstrap* de 1000 repetições.



Atividade hidrocarbonoclástica. Os isolados apresentaram uma maior porcentagem de remoção de óleo diesel nos ensaios realizados sob baixas concentrações de NaCl (0,1%). No entanto, porcentagens de remoção de 79% e 81%, obtidos por HC1 e HC5, respectivamente, foram evidenciados em condições salinas (10% de NaCl, Figura 2a).

Figura 2 - Atividade hidrocarbonoclástica dos isolados HC1 e HC5 em condições de baixa e alta salinidade (0,1 e 10% de NaCl). a) Remoção de óleo diesel. b) cinéticas de crescimento.



Ao analisar o perfil cinético, foi comprovado um maior crescimento dos isolados nas condições de baixa concentração de sais, o qual tem relação com a porcentagem de remoção obtida. O isolado HC5 apresentou os maiores níveis de crescimento nas condições avaliadas. Foi verificado, adicionalmente, que o crescimento utilizando óleo diesel como fonte de carbono foi sempre maior que o crescimento no meio usado como controle (meio mínimo), no qual não foi incorporada uma fonte de carbono exógena (Figura 2b). Esta condição confirma a utilização do óleo diesel por parte dos isolados em estudo, em condições de baixa e alta salinidade.

4. Conclusões

Os isolados bacterianos caracterizados neste trabalho apresentaram potencial hidrocarbonoclástico em condições de salinidade. Estas propriedades possibilitam o seu estudo no desempenho de processos de bioaumentação, com a finalidade de realizar o tratamento biológico das águas produzidas de petróleo.

5. Agradecimentos/Apoio financeiro

Os autores agradecem à Fundación Universitaria de San Gil (Yopal, Colômbia), pelo apoio financeiro.

Referências

ABOELWAFI, A. M.; ALWASIFY, R. S. Biodegradation Of Crude Oil Using Local Isolates Egyptian Environmental Affairs Agency (EEAA), Egypt . **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 4742–4751, 2009.

FAKHRU’L-RAZI, A. et al. Review of technologies for oil and gas produced water treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, n. 2-3, p. 530–551, 2009.

HII, Y. S. et al. Biodegradation of Tapis blended crude oil in marine sediment by a consortium of symbiotic bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 2, p. 142–150, mar. 2009.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 1 jan. 2013.

SHIHORA, N. A. Isolation and characterizations of halotolerant bacteria and identification by FAME analysis. **Biotechnology**, v. 3, n. 9, p. 51–53, 2013.