

Análise do impacto na microbiota de ambientes contaminados pelo escoamento de poluente BTEX oriundo de vazamentos de Postos de Combustíveis

Autores: Elisabete Vicente¹, Ronaldo Biondo¹, Claudionor G. Silva Filho¹, Carlos A. Brandt¹, Karlos A. Melo², Sérgio Kurozauwa², Ricardo Valente²

Laboratório: 1) BBT-Brazil e 2) KeyAssociados.

Contatos: kalosmelo@keyassociados.com.br
bevicent@gmail.com

Introdução:

Segundo a CETESB, os postos de combustíveis destacam-se na lista de áreas contaminadas do estado de São Paulo, sendo que até dezembro de 2013 foram identificados 3.597 pontos de contaminação ("sites"). Os vazamentos de tanques de postos de combustíveis são compostos por poluentes principalmente constituídos por hidrocarbonetos líquidos imiscíveis em água (**NAPLs** - "*Non-Aqueous Phase Liquid*") (Dong *et al.*, 2015). Quanto à densidade, os NAPLs podem ser divididos em duas classes:

- **DNAPL** ("*Dense Non-Aqueous Phase Liquid*" - Compostos de Fase Líquida Densa Não Aquosa): líquido imiscível e mais denso que a água que é representada por 1,2-dicloroetano (E).
- **LNAPL** ("*Ligh Non-Aqueous Phase Liquid*" - Compostos de Fase Líquida Leve Não Aquosa): líquido imiscível e menos denso que a água, representados por benzeno, tolueno e xileno (BTXE).

Estas contaminações constituem um grave problema ambiental da atualidade, demandando sérias consequências tanto para o solo quanto para os recursos hídricos subjacentes. Desta maneira, este problema se apresenta com demandas de desenvolvimento de técnicas de investigação, monitoramento e que possam resultar em soluções sustentáveis.

Neste trabalho, foi analisado o impacto na microbiota microbiana (bactérias e fungos) de águas coletadas em poços de monitoramento existentes no posto de gasolina, cuja contaminação química por BTEX vem sendo monitorada e também de áreas não contaminadas adjacentes às estas áreas.

Metodologia:

Determinação de UFC: Em cada estudo, a metodologia empregada consistiu em:

1) realização de análises físico-químicas de águas coletadas de pontos de coleta de postos de gasolina: pontos de áreas contaminadas e de área não contaminada adjacente; 2) determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de cada uma das amostras; 3) análise qualitativa dos microrganismos cultiváveis presentes nas amostras; e, 4) seleção de bactérias e fungos resistentes aos compostos presentes no poluente.

Para a determinação da UFC dos microrganismos presentes nas amostras, foram realizadas diluições seriadas de cada uma das amostras coletadas e 0,1 ml de cada diluição foi semeada em meio sólido: a) LA contendo 100µg/ml Anfotericina B (Sigma), para cultivo de bactérias e inibição de cultivo de fungos; e, b) YPD, contendo 200 µg/ml Ampicilina (Sigma), para cultivo de fungos e impedimento de crescimento de bactérias. As placas foram incubadas a 30°C em estufa, em condições de aerobiose e de anaerobiose em Jarra Gaspak (Sambrook & Russell 2001). Após 48h e 72 h as colônias foram contadas e analisadas visualmente.

Isolamento de bactérias resistentes a BTEX: Foi realizado o cultivo de 200 µl de amostra em tubos com 5 ml de meio líquido LB contendo em cada caso 1% de cada um dos componentes de BTEX (ou 1% de Tolueno, 1% Benzeno, 1% de etil-benzeno ou 1% de Xileno); e de 1% gasolina ou 1% diesel. Foi realizado o cultivo com agitação em "shaker", a 30°C, por 72 h.

Seleção de bactérias degradadoras de BTEX: Amostras de 1 ml foram inoculados em frascos erlenmeyers de 50 mL contendo meio mineral desenvolvido pela BBT-Brazil modificado de M9 MJS (Sambrook & Russell 2001) com 100µg/ml de Anfotericina B (Sigma) e 0,5% de cada um dos compostos BTEX ou gasolina ou diesel. As culturas foram incubadas em "shaker" sob agitação de 180 rpm, a 30°C, até que fosse observado crescimento. Colônias isoladas foram obtida e as bactérias mais promissoras foram caracterizadas identificadas. Foram, então, armazenadas em microtubos do tipo "Eppendorf" em meio contendo 30% de glicerol 99%, a -70°C ou estocados em ágar semi-sólido inclinado em tubos.

Resultados:

Os resultados obtidos indicam que os agentes químicos contaminantes promovem um severo impacto na microbiota de bactérias aeróbias, bactérias anaeróbias, fungos filamentosos e leveduras isoladas de águas contaminadas quimicamente coletadas de pontos de postos de gasolina, em relação a microbiota presente em água de pontos adjacentes sem contaminação química: PM-01 (área quimicamente não contaminada); PM-11 (com contaminação em fase dissolvida); PM-13 (com histórico de fase livre de óleo queimado) (Quadro 1, Figura 1).

Quadro 1: Concentrações de microrganismos presentes nas amostras de água dos pontos de coleta do Posto de gasolina.

Microorganismos	PM01	PM11	PM13
	Controle concentrações < LQ	Fase dissolvida	Histórico de fase leve
Bactérias aeróbias	$1,03 \times 10^3$	$6,5 \times 10^2$ (>1/2)	$1,29 \times 10^2$ (>10x)
Fungos	$1,5 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$ (aprox.=)	$1,8 \times 10^3$ (>10x)
Bactérias anaeróbias*	$1,11 \times 10^3$	$1,4 \times 10^2$ (>10x)	$1,04 \times 10^4$ (>10x)

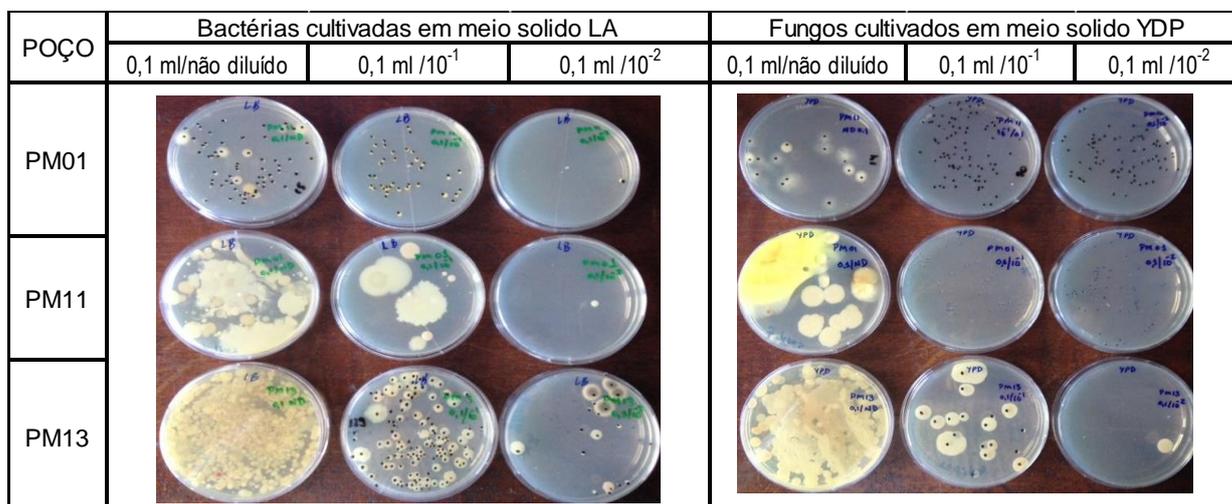


Figura 1: Microrganismos isolados de águas de diversos pontos de posto de gasolina.

O impacto se revela em termos de: 1) redução da quantidade de microrganismos (PM-01 em relação a PM011); 2) redução da diversidade microbiana (PM-13 em relação a PM-01).

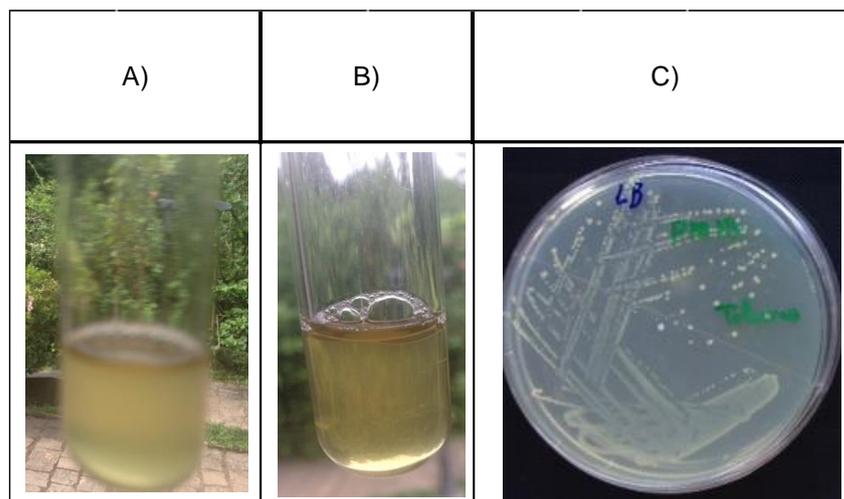


Figura 2: Cultivo bacteriano de amostras de águas contaminadas em: A e B) meio líquido LB em meio LB com 1% de Tolueno; C) Seleção de colônias isoladas em LA.

Ainda, foram realizados seleção de bactérias resistentes a altas concentrações de componentes do BTEX, como Tolueno (Figura 2).

Discussão:

Trabalhos Futuros: Neste momento, iniciam-se os estudos do impacto da contaminação sobre a microbiota bacteriana total (incluindo as bactérias não cultiváveis) empregando técnicas metagenômicas que consistem no sequenciamento e análise do DNA codificador do RNA 16S de procaríotos (bactérias e arqueias) isolado diretamente de águas contaminadas de postos de gasolina e de área adjacente não contaminada, visando estabelecer uma metodologia mais abrangente, que permita estabelecer um protocolo geral padronizado.

Perspectivas: Entende-se que este trabalho nos permitirá desenvolver bio-indicadores de deste tipo de poluente (BTEX) e contribuirá para o desenvolvimento de novas metodologias que permitirão melhor monitoramento ambiental além de permitir a seleção de microbiota autóctone com grande capacidade de realizar a Biorremediação Ambiental.

Referências bibliográficas:

- CETESB (<http://www.cetesb.sp.gov.br/>)
- Dong Y, Wang B, Jiang J, Guan X, Gao S, Yang A, Chen Z, Sun H. **Bioremediation** of Petrochemical Wastewater Containing **BTEX** Compounds..... Appl Biochem Biotechnol. 2015.
- Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor; 2001.