

# 6º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS



## TÍTULO DO TRABALHO:

Avaliação do impacto da contaminação por petróleo em ambientes de mangue na Bacia Petrolífera Potiguar através da bioprospecção de sulfobactérias.

## AUTORES:

<sup>#</sup>Ciáxares M. Carvalho, <sup>\*</sup>Bruno G. de Sousa, <sup>1</sup>Djalma R. da Silva,

<sup>2</sup>Paulo S. M. Lucio, <sup>2</sup>Carlos A. G. Blaha,

## INSTITUIÇÃO:

<sup>1</sup>NUPPRAR/UFRN, <sup>2</sup>LBMP-DBG/UFRN, <sup>#</sup>PPgCEP/UFRN, <sup>\*</sup>PPgCB/UFRN

Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN – Brasil

*Este Trabalho foi preparado para apresentação no 6º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás- 6º PDPEURO, realizado pela Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás-ABPG, no período de 09 a 13 de outubro de 2011, em Florianópolis-SC. Esse Trabalho foi selecionado pelo Comitê Científico do evento para apresentação, seguindo as informações contidas no documento submetido pelo(s) autor(es). O conteúdo do Trabalho, como apresentado, não foi revisado pela ABPG. Os organizadores não irão traduzir ou corrigir os textos recebidos. O material conforme, apresentado, não necessariamente reflete as*

## **Avaliação do impacto da contaminação por petróleo em ambientes de mangue na Bacia Petrolífera Potiguar através da bioprospecção de sulfobactérias.**

### **Abstract**

The presence of Sulphur-bacteria (PRS) on oil facilities result in economic and toxicological damages. However, these same microorganisms have important environmental role in mangroves and other ecosystems. This work was performed with metagenomic sampling to detect the presence of PRS in Paracuru / CE, localized in Petroleum Basin Potiguar, through experiments in microcosms contaminated with 3% crude oil. The presence of PRS was detected in both pure and contaminated samples in the first two sampling times. There were comparisons with reference to the literature, showing that the methodology used in the two studies is complementary with respect to inspections, and with the results on fluctuating populations of PRS. This work contributes to the understanding of microbial communities in the sensitive areas to oil spills, providing crucial information to the development of sustainable strategies in SMS area in the oil industry, such as bioremediation of oil contaminated sediments.

### **Introdução**

As sulfobactérias ou procariotos redutores de sulfato (PRS) são responsáveis por danos à indústria de petróleo, como *souring*, biodegradação do óleo e biocorrosão das superfícies metálicas nas instalações industriais. A produção de H<sub>2</sub>S através do metabolismo desses microrganismos expõe a sérios riscos de saúde os trabalhadores devido à sua alta reatividade, corrosividade e capacidade de intoxicação (Carvalho et al., 2007; Muyzer e Stams, 2008).

Em 1952, Mackenzie (Apud Updegraff e Wren, 1954) relatou que os PRS utilizavam petróleo cru em seu metabolismo. De lá para cá muito foi desvendado sobre a ecologia desses microrganismos, sua atuação no ciclo do enxofre, removendo sulfatos e metais pesados de cursos d'água e, particularmente, sobre a redução desassimilatória de sulfato, importante reação na geração de energia metabólica e processo relacionado à biodegradação do petróleo e derivados (Muyzer e Stams, 2008).

A Bacia Petrolífera Potiguar (BPP) compreende os estados do Rio Grande do Norte e do Ceará. Ao longo da costa desses estados da Federação, milhares de poços produtores *onshore* e *offshore* recebem injeção de água produzida ou água do mar para aumento da pressão dos reservatórios. Durante a recuperação secundária, quando água é injetada para produzir o petróleo remanescente, a produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) é um problema comum. Os PRS reduzem sulfato a sulfeto na água de injeção, enquanto oxidam doadores orgânicos de elétrons presentes no reservatório de petróleo. Em operações *offshore*, quando água do mar é injetada, este problema é ainda maior devido à alta concentração de sulfato no ambiente marinho (Hubert e Voordouw, 2007; Carvalho, 2008).

Melo et al. (1999) realizaram uma caracterização geoambiental da região costeira entre Paracuru e Fortaleza e classificaram o manguezal de Paracuru como índice de sensibilidade ambiental (ISL) grau 10, segundo classificação IBAMA-MMA. E explicam: os manguezais são os ambientes mais sensíveis a derrames de óleo e derivadas. São ambientes de baixa energia, com substrato plano, lamoso a arenoso, sendo mais comuns os solos muito orgânicos lamosos, apresentam declividade baixa e por isso uma larga zona intermarés, com sedimentos saturados com água o que lhes confere uma baixa permeabilidade, no entanto, o óleo às vezes percola através de orifícios no substrato feitos

por animais ocasionando grandes prejuízos. Destacadamente, o bioma do manguezal é uma interface crítica e frágil da fronteira entre o oceano e o continente.

De acordo com o mapa de sensibilidade ambiental elaborado por Silveira et al (2003), os manguezais da área compreendida entre Macau e Guamaré/RN estão classificados como ISL grau 10 (especificações NOAA, 1997 e MMA, 2002), considerando os habitats, atividades socioeconômicas e feições morfológicas locais.

As populações de PRS crescem anaerobicamente nos ambientes, mas estão submetidas à influência da contaminação por petróleo em diversos ecossistemas, sobretudo os ecossistemas costeiros, como os manguezais. O estudo da diversidade indígena de PRS em sedimentos de manguezais é importante para determinar as possibilidades de resposta a eventuais contaminações por petróleo nesses ambientes, bem como no abastecimento de água da indústria petrolífera. Além dos trabalhos com PRS, outros têm sido realizados com utilização da metagenômica para caracterização das comunidades procarióticas da BPP por diversos autores: Santos, 2006; Pereira, 2007; Silva, 2007; Blaha et al, 2007, 2008, Sousa, 2011.

A quantificação da presença de genes metabólicos chaves, como o gene *dsrB* envolvido com a redução de sulfato por PRS em sedimentos de ambientes anaeróbicos, como manguezais, contribui para o discernimento do estado metabólico de processos importantes, revelando informações sobre as perturbações populacionais resultantes da contaminação por petróleo, por exemplo. Essas informações são cruciais para o desenvolvimento de estratégias de biorremediação de ambientes impactados devido à possibilidade de indicação dos níveis potenciais de expressão dos genes desejáveis para a biorremediação e à sugestão de modificações nos melhoramentos para superar as limitações nutricionais ou outros estresses ambientais, como a presença do petróleo (Villanueva et al, 2008, Carvalho et al, 2007).

Este trabalho objetiva a detecção de PRS em sedimentos de manguezal da BPP, utilizando a bioprospecção molecular de metagenoma obtida por meio de ensaios de simulação (microcosmos) de contaminação por petróleo cru na localidade de Paracuru/CE. É também objetivo deste trabalho comparar a metodologia empregada em análises anteriores realizadas na localidade de Diogo Lopes (Carvalho et al, 2007).

### **Metodologia**

#### **- Amostragem de sedimento e construção de microcosmos**

Foram realizadas coletas de sedimentos de manguezal em Paracuru-CE (3°24'38.72" S 39°03'19.55" O). 420g do sedimento homogeneizado foram separados em dois recipientes (massa final 210g para cada microcosmo), um sem contaminação com petróleo (controle) e outro contaminado com 3% de petróleo cru pasteurizado.

Os microcosmos foram acondicionados no laboratório num ambiente com temperatura média de 28°C e sem contato direto com a luz solar. A manutenção do potencial hídrico do solo foi realizada repondo água autoclavada retirada no local da coleta. A reposição hídrica e a homogeneização das amostras ocorreram a cada 30 dias.

As amostras de sedimentos de manguezal dos microcosmos foram realizadas nos tempos: 0, 3, 7, 14, 28, 60, 63, 67, 74, 88 e 120 dias. No tempo 0 foram retirados 10g dos sedimentos puro e contaminado para análises complementares. A partir do tempo 3 foram removidos de cada microcosmo 3g de sedimento em cada tempo, condicionados em microtubos e conservados a -20°C.

#### **- Isolamento de DNA metagenômico (mDNA) dos microcosmos**

O DNA metagenômico das amostras foi extraído utilizando um procedimento otimizado seguindo as recomendações do fabricante, através do kit FastDNA® SPIN (BIO101, Carlsbad, CA, USA). O DNA extraído com o kit foi quantificado por espectrofotometria observando-se a OD260nm (*Nanodrop*) e posteriormente padronizado para as reações da PCR. Todas as amostras de DNA metagenômico foram diluídas para uma concentração final de ~30ng/μl.

#### - Obtenção dos perfis da PCR

Foram utilizadas sequências iniciadoras (*primers*) para o gene *dsrB*, envolvido na rota metabólica de redução do sulfato. As amplificações por PCR foram realizadas no termociclador Techne TC-512 contendo as seguintes concentrações finais: 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 45mM KCl, 0,2mM de dNTP's, 1,5ng/μl de DNA molde, 2pmol/μl de cada Primer, 0,5U de Taq DNA Polimerase (TaqGen Biosystems) e Tampão de Enzima 1x, para um volume final de 20μl. O programa utilizado para as amplificações do DNA metagenômico consiste em: 94 °C por 5 min, seguido por 10 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, decréscimo para anelamento a 65 °C – 55 °C por 30 s, e alongamento a 72 °C por 1 min e uma extensão final a 72 °C por 30 min.

Os *amplicons* gerados nas reações da PCR com os oligonucleotídeos desenvolvidos para detecção do gene metabólico *dsrB* foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1.5% (2 horas a 100V e 100mA), visualizados com brometo de etídeo em transiluminador UV e fotodocumentadas.

### Resultados e Discussão

Detectou-se a presença de PRS através de produtos de amplificação nos dois primeiros tempos de amostragem, tanto nas amostras contaminadas, como naquelas sem contaminação por petróleo, respectivamente 0P, 0C, 3P, 3C (Tabela 1). Os demais tempos não apresentaram amplificações visíveis. Este resultado sugere uma diminuição inicial rápida na presença de PRS no sedimento de manguezal de Paracuru. Analisando o sedimento de manguezal de Diogo Lopes, Carvalho et al (2007) detectaram a presença de PRS durante os 180 primeiros dias de amostragem, considerando amostras com e sem contaminação (0P, 0C, 60P, 60C, 120C, 180P e 180C) (Tabela 1).

Tabela 1: Detecção de procariotos redutores de sulfato em ensaios de microcosmos com amostras ambientais de sedimento de manguezal das localidades de Paracuru/CE e Diogo Lopes/RN (Carvalho et al, 2007) contaminadas por petróleo e sem contaminação (Puro). Distribuição das amplificações ao longo dos dias de amostragem identificadas por “PRS”.

| Localidade  | Microcosmo  | Intervalos das amostragens em dias |     |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
|-------------|-------------|------------------------------------|-----|---|----|----|----|----|----|----|----|-----|
|             |             | 0                                  | 3   | 7 | 14 | 28 | 60 | 63 | 67 | 74 | 88 | 120 |
| Paracuru/CE | Puro        | PRS                                | PRS | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -   |
|             | Contaminado | PRS                                | PRS | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -   |

| Localidade     | Microcosmo  | Intervalos das amostragens em dias |     |     |     |     |     |     |
|----------------|-------------|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                |             | 0                                  | 60  | 120 | 180 | 240 | 300 | 360 |
| Diogo Lopes/RN | Puro        | PRS                                | PRS | -   | PRS | -   | -   | -   |
|                | Contaminado | PRS                                | PRS | PRS | PRS | -   | -   | -   |

Diante da detecção do biomarcador molecular *dsrB* nos tempos 120 e 180 dias em Diogo Lopes, é possível inferir que as comunidades de PRS residentes no sedimento de manguezal desta localidade apresentam maior resistência à presença do petróleo em comparação com aquelas amostradas em Paracuru. Também é válido ressaltar que propriedades físico-químicas dos sedimentos dessas comunidades, biocompetição e presença de biocidas podem estabelecer as diferenças observadas nos dois sedimentos, conferindo uma percepção de maior amplitude temporal aos PRS de Diogo Lopes, mesmo na ausência dos contaminantes do petróleo. Estas observações são importantes para a tomada de decisão em caso da necessidade de empregar técnicas de biorremediação, tanto em Paracuru, como em Diogo Lopes. Contudo, outros parâmetros ambientais e na composição da microbiota indígena precisam ser esclarecidos para que seja possível afirmar sobre diferenças na viabilidade do desenvolvimento e aplicação de técnicas de biorremediação nesses sedimentos.

### Conclusões

A conciliação dos trabalhos de determinação do grau de sensibilidade ambiental com os estudos sobre a microbiota indígena de ecossistemas costeiros cria a possibilidade de ressaltar a importância da conservação desses ambientes, uma vez que as informações sobre os riscos ambientais podem servir de base para o conhecimento sobre como remediar os prejuízos decorrentes dos impactos advindos da ação antropogênica.

Este trabalho é importante para o desenvolvimento de estratégias de SMS, pois o conhecimento sobre a microbiota associada ao petróleo, ressaltando-se a contribuição das sulfobactérias (ou PRS) nas alterações que causam no petróleo e em seus derivados, é de grande valia para viabilizar o controle sustentável dos prejuízos econômicos, laborais e ambientais relacionados.

### Agradecimentos

Ao CNPq pelo auxílio financeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Petróleo (PPgCEP/UFRN).

### Referências Bibliográficas

BLAHA, C. A. G.; SANTOS, I. L. V. L.; PEREIRA, M. S.; CARVALHO, M. C.; SILVA, C. L. V. S.; MELO, J. T. A.; SILVA, A. L. S.; MEDEIROS, S. R. B.; LIMA, L. F. A. Metagenomic evaluation of indigenous microbial diversity in tropical mangrove and semi-arid soils from petroliferous basin. **Journal of Biotechnology**, v131, Issue 2, Supplement 1, Page S239, 2007.

BLAHA, C. A. G.; CARVALHO, C. M.; SILVA, A. L. S.; SANTOS, I. L. V. D.; PEREIRA, M. S. ; SILVA, C. L. V.; MELO, J. T. A.; SOUSA, B. G.; MEDEIROS, SILVIA R BATISTUZZO DE; LIMA, LUCYMARA FASSARELLA AGNEZ. Bioremediation in tropical mangrove and semi-arid soils from petroliferous basin: metagenomic evaluation of responsive indigenous microbial communities. In: 4th European Bioremediation Conference, Chania, Grecia, 2008.

CARVALHO, C.M. **Ecogenômica de Archaea e monitoramento de comunidades de procariotos redutores de sulfato em metagenomas**: aplicações na indústria de petróleo e gás. Dissertação de Mestrado PPg-GBM, UFRN, 2008.

CARVALHO, C. M. ; LIMA, LUCYMARA FASSARELLA AGNEZ ; MEDEIROS, SILVIA R BATISTUZZO DE; BLAHA, C. A. G. Detection of sulfate-reducing prokaryotes (SRPs) in environmental samples from the mangrove of Diogo Lopes, Petroliferous Basin Potiguar (BPP). In: 4 Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás, Campinas-SP, 2007.

HUBERT, C. AND VOORDOUW, G. Oil Field Souring Control by Nitrate-Reducing *Sulfurospirillum* spp. That Outcompete Sulfate-Reducing Bacteria for Organic Electron Donors. **Applied and environmental microbiology**, p. 2644–2652, 2007.

MELO, R. R; MAIA, L. P; UCHOA MONTEIRO, L. H. (1999). **Caracterização geoambiental da região costeira entre Fortaleza e Paracuru – subsídios para a elaboração de mapa de sensibilidade ambiental**. Disponível em:

[http://www.iepa.ap.gov.br/temp1/IEPA/CPAq/PETRORISCO/OUTROS/RafaelMelo\\_resumo\\_Petrorisco\\_CE.pdf](http://www.iepa.ap.gov.br/temp1/IEPA/CPAq/PETRORISCO/OUTROS/RafaelMelo_resumo_Petrorisco_CE.pdf). Acesso em 19-05-2011.

MUYZER, G AND STAMS, A. J. M. The ecology and Biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews**, p 441-454, 2008.

PEREIRA, M.S. **Estudos in silico da proteína AlkB e prospecção de bactérias alcanotróficas em solos da Bacia Petrolífera Potiguar**. Dissertação de Mestrado PPg-GBM, UFRN, 2007.

SANTOS, I.L.V. DE L. **Estudo de populações microbianas em solos contaminados por petróleo**. Dissertação de Mestrado PPg-GBM, UFRN, pp63, 2006.

SILVA, A. L. S.; SILVA, C. L. V.; LIMA, LUCYMARA FASSARELLA AGNEZ ; MEDEIROS, SILVIA R BATISTUZZO DE; GALINDO BLAHA, C.A. Detection of Fe (III) reducing bacteria in mangrove of potiguar petroliferous basin with petroleum biodegrading potential. In: 4 Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás, Campinas-SP, 2007.

SILVEIRA, I. M.; VITAL, H.; AMARO, V. E.; GRIGIO, A. M. Carta de sensibilidade ambiental ao derramamento de óleo para a área entre Guamaré e Macau-RN. In: 2º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás, Salvador-BA, 2003.

SOUSA, B. G. **Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos: prospecção metagenômica e modelagem computacional 3-D de proteínas**. Dissertação de Mestrado PPgCB, UFRN, 2011.

UPDEGRAFF, D. M. AND WREN, G. B. The Release of Oil from Petroleum-Bearing Materials by Sulfate-Reducing Bacteria. **Field Research Laboratories, Magnolia Petroleum Company**, Dallas, Texas, p 309-322, 1954.

VILLANUEVA, L.; HAVEMAN, S. A.; SUMMERS, Z. M.; LOVLEY, D. R. Quantification of *Desulfovibrio vulgaris* Dissimilatory Sulfite Reductase Gene Expression during Electron Donor- and Electron Acceptor-Limited Growth. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 5850–5853, 2008.