

---

## BIODEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO E PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR BACTÉRIAS INDÍGENAS DO SEDIMENTO DO MANGUEZAL DE GARGAÚ - RJ

*Silva, A.M.F.D.<sup>1</sup>, Wetler-Tonini, R.M.C.<sup>2</sup>, Wagener, A.L.R.<sup>3</sup>, Grativol, A.D.<sup>4</sup>,  
Rezende, C.E.<sup>5</sup>*

<sup>1</sup>UENF/Laboratório de Ciências Ambientais, alineonline\_pib@hotmail.com

<sup>2</sup>UENF/ Laboratório de Ciências Ambientais, micro\_rita@yahoo.com.br

<sup>3</sup>PUC-RJ/ Departamento de Química, angela@puc-rio.br

<sup>4</sup>UENF/ Laboratório de Ciências Ambientais, adgrativol@uenf.br

<sup>5</sup>UENF/ Laboratório de Ciências Ambientais, crezende@uenf.br

**Resumo** – O presente trabalho consistiu em isolar e cultivar bactérias utilizando petróleo como única fonte de carbono e avaliar a produção microbiana de biossurfactante utilizando glicose. Uma alíquota do sedimento coletado foi diluído serialmente e plaqueado em meio para heterotróficos totais e em meio para degradadores de petróleo. Após crescimento foi realizada contagem dos microrganismos, aqueles que cresceram em meio para degradadores de petróleo foram isolados em placas de ágar nutriente e submetidos ao teste de colapso da gota para avaliação quanto à capacidade de produção de biossurfactante. Outra alíquota do sedimento foi incubada com 2% de petróleo até a degradação visual do poluente e o procedimento anterior foi repetido. Obteve-se diferença na contagem dos microrganismos após a incubação com o petróleo e quanto ao meio de cultura utilizado, demonstrando a ação seletiva do poluente sobre a comunidade microbiana do manguezal estudado. Além disso, foram obtidas bactérias indígenas do sedimento capazes de produzirem biossurfactante, indicando sua aplicabilidade em processos de biorremediação.

**Palavras-chave:** colapso da gota, HPAs, biorremediação

**Área do Conhecimento:** Ecologia

### Introdução

Manguezais são ecossistemas costeiros muito sensíveis, principalmente a distúrbios humanos, como acidentes de contaminação por petróleo, que podem provocar a morte do manguezal por atuarem como tensores crônicos perpetuando seu impacto por longo prazo (VARJABEDIAN, 1995). Para minimizar tais efeitos, foram desenvolvidas técnicas biológicas para

remoção deste poluente. Estas técnicas são mais simples, eficientes e de menor custo quando comparadas a métodos físicos e químicos. Estudos sugerem que comunidades microbianas indígenas apresentam potencial considerável para remediar sedimentos contaminados por óleo (YU *et al.*, 2005).

A sorção dos componentes hidrofóbicos do petróleo às partículas de sedimento limita sua biodisponibilidade, reduzindo a eficiência da biorremediação. Algumas

bactérias, no entanto, possuem capacidade de produzir biossurfactantes, compostos com características de detergência que facilitam a degradação do poluente (KREPSKY *et al.*, 2007).

O presente trabalho apresentou como objetivo isolar e cultivar bactérias utilizando petróleo como única fonte de carbono e avaliar a produção microbiana de biossurfactante utilizando glicose.

### **Metodologia**

A área de estudo do presente trabalho foi uma área de manguezal nas proximidades da vila de pescadores de Gargaú situado no estuário secundário do rio Paraíba do Sul.

Foi realizada uma coleta do sedimento superficial (0 a 5 cm) em 18 pontos aleatórios formando uma amostra composta. A seguir, o material foi resfriado e levado em recipiente isotérmico para o Laboratório de Ciências Ambientais (LCA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), para processamento. Parte da amostra foi congelada e enviada em triplicatas em recipientes descartáveis de alumínio para o laboratório da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ) para análises de hidrocarbonetos a fim de determinar origem, quantidade, e os tipos presentes no sedimento.

Para obtenção das bactérias com potencial para degradação de petróleo e produção de biossurfactante foram realizados dois tratamentos com o sedimento, um antes da incubação com petróleo (VA) e outro após a incubação (VD).

No primeiro tratamento, dez gramas de sedimento foram incubados com 90

mL de tampão fosfato de potássio sob agitação a  $\pm 28^\circ\text{C}$  por 28 dias. Nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 foram feitas diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) em NaCl (0,85%) e inoculação em placas com meio de cultura para heterotróficos totais e em placas com meio mineral contendo ágar bacteriológico como agente solidificante e 0,5% de petróleo como única fonte de carbono (LI *et al.*, 2000 modificado). As colônias foram contadas após 48h de incubação a  $28^\circ\text{C}$ .

No segundo tratamento, outros dez gramas de sedimento foram incubados com 90 mL de meio mineral contendo 2% de petróleo, mantidos sob agitação a 200 rpm à  $\pm 28^\circ\text{C}$  até a degradação visual do poluente, que ocorreu em aproximadamente cinco meses. Assim, repetiu-se o procedimento de plaqueamento e contagem.

Após contagem, os microrganismos que cresceram em meio seletivo para degradadores de petróleo tanto antes como após a incubação com o poluente foram isoladas em placas com ágar nutriente. A seguir, foram transferidos para tubos de ensaio com TSB (Triple Soy Broth) e incubados a  $\pm 28^\circ\text{C}$  por 24h. A solução foi visualizada a fresco em lâminas coradas com Lugol com o auxílio de microscópio óptico.

A fim de avaliar a capacidade das bactérias isoladas em produzir biossurfactante, 100 $\mu\text{L}$  da solução bacteriana em TSB foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio mineral acrescido de glicose a 1% como única fonte de carbono. Após incubação a  $28^\circ\text{C}$  por 48h, os inóculos foram padronizados para densidade 2 com o uso do cartão de Wickerham (TOSTA, 2004).

A seguir, 500 $\mu\text{L}$  das soluções padronizadas foram inoculados em

Erlenmeyers com 9,5mL de meio mineral com 2% de glicose como única fonte de carbono. Após 72h de crescimento em estufa a 28°C, realizou-se o teste de colapso da gota a fim de verificar a produção de biossurfactante. Para tal, 100µL das suspensões foram inoculados em "poços" de placas de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) preenchidos com 50µL de óleo mineral. Após 1 minuto de reação, o resultado foi determinado visualmente em microscópio estereoscópio; considerando-se positiva a produção de biossurfactante quando houve colapso da gota de óleo mineral. O controle positivo foi preparado utilizando-se SDS (dodecil sulfato de sódio) a 25% no lugar das amostras e o controle negativo utilizando água milli-Q esterilizada.

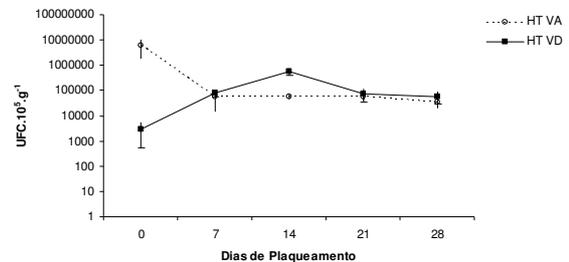
Estão sendo realizadas análises de TRFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), para se obter o perfil da diversidade bacteriana presente no sedimento antes e depois da incubação com o petróleo.

## Resultados

De acordo com as análises realizadas pela PUC-RJ, no sedimento do manguezal estudado não foram detectados HPAs (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos) de origem petrogênica e sim de fontes de combustão ou de biomassa.

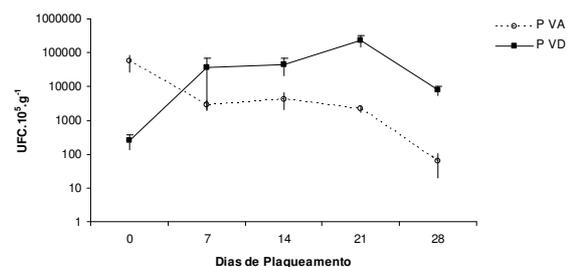
Houve diferença nas contagens dos microrganismos de acordo com o tipo de meio de cultura utilizado. Observando-se valores entre  $10^9$  a  $10^{11}$  UFC. g<sup>-1</sup> de sedimento para a contagem de heterotróficos totais na amostra antes da incubação com petróleo (HT VA), e  $10^8$  a  $10^{10}$  UFC. g<sup>-1</sup> de sedimento para a

amostra após a incubação com o poluente (HT VD).



**Figura 1: Contagem de microrganismos e meio para heterotróficos totais antes e após incubação com petróleo.**

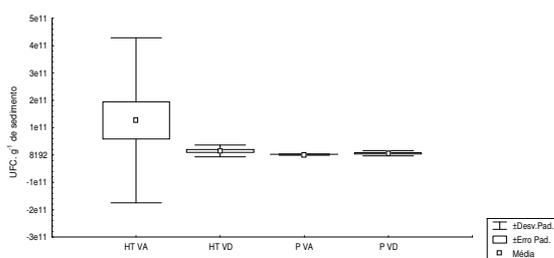
A contagem nas placas com meio seletivo para degradadores de petróleo variou entre  $10^6$  e  $10^9$  UFC. g<sup>-1</sup> de sedimento para a amostra antes da incubação com o poluente (P VA), e entre  $10^7$  e  $10^{10}$  UFC. g<sup>-1</sup> de sedimento após a incubação da amostra com petróleo (P VD).



**Figura 2: Contagem de microrganismos em meio de cultura seletivo para degradadores de petróleo antes e após incubação com petróleo.**

Foi realizada uma ANOVA a fim de verificar diferenças nas contagens das colônias, de acordo com o meio de cultura utilizado, bem como a influência

da incubação com o petróleo sobre o número de microrganismos das placas. Foi observada diferença significativa entre algumas contagens, com  $p=0,030$   $F(3,76)=3,12$



**Figura 3: Box-plot demonstrando contagens de microrganismos em meio HT e em meio seletivo para degradadores de petróleo.**

Foi isolado um total de 112 colônias, das quais, aproximadamente 53% foram capazes de produzir biossurfactantes.

### Discussões

Antes da incubação com o petróleo o número de heterotróficos totais era maior que o número de degradadores, no entanto essa diferença deixa de ser observada após a incubação, pois a comunidade de heterotróficos diminuiu. Isto demonstra que o impacto do petróleo sobre a comunidade microbiana indígena pode ter selecionado apenas os microrganismos degradadores.

Estudos indicam que tanto a concentração, quanto o tempo de exposição aos HPAs causam redução da diversidade de microrganismos, sugerindo assim, que a comunidade do sedimento foi afetada pela contaminação e que a presença do poluente pode causar o aumento das populações microbianas capazes de se

adaptarem às novas condições e a diminuição daquelas que são sensíveis ao petróleo (SANTOS, 2004; ZHOU *et al.* 2009.)

Quanto a produção de biossurfactantes pelos microrganismos, esses dados comprovam os resultados de TUGRUL & CANSUNAR (2005), que utilizaram a mesma metodologia para demonstrar a capacidade de produção de biossurfactantes por bactérias. De acordo com BODOUR *et al.* (2003), estudos sugerem que a produção destes metabólitos aumentam a disponibilidade dos HPAs, constituindo uma importante ferramenta no auxílio à degradação destes compostos pela microbiota.

### Conclusões

Através deste estudo podemos inferir que microrganismos indígenas do sedimento do manguezal estudado possuem capacidade para a produção de biossurfactantes e utilizar compostos do petróleo como fonte de carbono para seu crescimento. Assim, esses microrganismos indicam uma alternativa promissora em processos de biorremediação auxiliando na redução da concentração e toxicidade dos vários componentes do petróleo derramado.

Podemos concluir também, que este poluente exerce atividade seletiva sobre a comunidade microbiana do sedimento testado, uma vez que a comunidade de heterotróficos totais diminuiu.

### Referências Bibliográficas

BODOUR, A. A.; DREES, K. P.; MAIER, R. M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in

- undisturbed and contaminated arid southwestern soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3280–3287, 2003.
- KREPSKY, N., DA SILVA, F.S., FONTANA, L.F. & CRAPEZ, M.A.C. Alternative methodology for isolation of biosurfactant-producing bacteria. **Brazilian Journal of Biology**, 67(1): 117-124, 2007.
- LI, G.; HUANG, W.; LERNER, D. N. & ZHANG, X. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. **Water Research**. 34. 3845-3853, 2000.
- SANTOS, A. C. F. Utilização do tolueno como única fonte de carbono por microrganismos Isolados de um Landfarming. **Monografia de Graduação**, Universidade Estadual de Santa Cruz, BA, 2004.
- TOSTA, C. D. Biotipagem de leveduras industriais através do sistema killer. **Dissertação de mestrado**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP, 2004.
- TUGRUL, T. & CANSUNAR, E. Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 21: p. 851–853, 2005.
- VARJABEDIAN, R. Impacto sobre os manguezais, *In: zal: ecossistema entre a terra e o mar*. Yara Schaeffer-Novelli. **Caribbean Ecological Research**. São Paulo. Cap. 11, p. 49-51, 1995.
- YU, S. H.; KE, L.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Y. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. **Environment International**, n. 31, p. 149-154, 2005.
- ZHOU, H. W.; Wong, A. H. Y.; YU, R. M. K.; PARK, Y. S.; TAM, N.F.Y. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced Structural Shift of Bacterial Communities in Mangrove Sediment. **Microbial Ecology**, v. 58, p. 153–160, 2009.