



## Análise da degradação de petróleo em meio aquoso a partir da atuação de micro-organismos isolados do solo

**Caroline Salvati<sup>1</sup>, Daniela Goetze<sup>1</sup>, Roberta Bussamara<sup>1</sup>, Marilene Henning Vainstein<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica/ Centro de Biotecnologia/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul (csalvati@cbiot.ufrgs.br)

### Resumo

Derramamentos de petróleo no meio ambiente causam sérios problemas ambientais, devido à lenta degradação. A biorremediação é uma técnica que utiliza micro-organismos para degradar poluentes de áreas contaminadas e, por ser um processo natural, tem ganhado muito destaque. Há micro-organismos descritos com capacidade de metabolizar o petróleo. O objetivo da pesquisa é isolar, identificar e analisar o potencial biodegradador dos micro-organismos isolados do solo. Foram isolados 19 micro-organismos a partir de amostras de solo, contendo bactérias, fungos filamentos e fungos leveduriformes. Para análise do potencial degradador, foi montado um teste prévio, que consistiu na inoculação de uma quantidade controlada de células dos micro-organismos em seis meios diferentes, com e sem salinidade e nutrientes. O sistema foi incubado em Shaker (90 rpm) por 7 dias a 30°C. Foi realizada uma análise visual da degradação do petróleo pela alteração do formato da gota e surfactação dos hidrocarbonetos e por determinação da densidade óptica do meio, que indica a variação da concentração de células. Seis micro-organismos foram selecionados (três bactérias e três leveduras). Três cepas (MO4a, MO4b e B2) mostraram produzir rhamnolípido, um tipo de biosurfactante extracelular. A cepa B1 trata-se de *Yarrowia Lipolytica* e outros micro-organismos estão sendo identificados por sequenciamento de regiões conservadas do DNA.

**Palavras-chave:** Petróleo. Biodegradação. Biosurfactante.

**Área Temática:** Tecnologias Ambientais

### Abstract

*Oil spills causes serious environmental problems due to slow degradation. Bioremediation is a technique that uses microorganisms to degrade pollutants from contaminated areas. It is a natural process, so it has gained much prominence. Microorganisms capable to metabolize the petroleum are described. The objective of this research is to isolate, identify and analyze the biodegradation potential of soil microorganisms. We isolated 19 microorganisms from soil samples, containing bacteria, filaments fungus and yeasts. For analyse the petroleum biodegradation potential, we prepared a previous test, which consisted in the inoculation of a controlled amount of microorganisms cells in six different media, with and without salinity and nutrients. The system was incubated in a shaker (90 rpm) for 7 days at 30 °C. We analyzed visually the degradation of oil by altering the drop shape and surfactant production and we determinated the optical density of the medium, which indicates the quantity of cells. Six micro-organisms were selected (three bacteria and three yeasts). Three strains (MO4a, MO4b and B2) shown to produce rhamnolipid, which is a type of extracellular biosurfactant. The strain B1 was identified as *Yarrowia lipolytica* and other microorganisms are being identified by sequencing of conserved regions of DNA.*

**Key words:** Petroleum. Biodegradation. Biosurfactant.

**Theme Area:** Environmental Technologies



## 1 Introdução

O petróleo é um composto orgânico formado basicamente por uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. Possui grande importância em diversos setores e é considerado uma das maiores fontes de energia atual (PETROBRÁS, 2010). O Brasil tem se destacado na área de exploração de petróleo, alcançando a 12ª posição entre os maiores produtores mundiais de petróleo em 2010 (ANP, 2011).

Durante o processamento do petróleo, podem ocorrer vazamentos, causando sérios problemas ambientais. O petróleo, quando derramado em água, forma uma mancha negra que impede a passagem da luz e reduz a taxa de oxigênio dissolvido na água. Além disso, o petróleo é tóxico (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2003).

A biorremediação é uma técnica de recuperação de áreas e águas contaminadas com substâncias potencialmente perigosas pela utilização de micro-organismos (fungos, leveduras ou bactérias) que metabolizam o poluente, transformando-o em substâncias inócuas ou menos agressivas (USEPA, 1996c). Por ser um processo natural, promove um tratamento adequado ao meio e o custo é relativamente baixo quando comparado à outras alternativas convencionais de tratamento de áreas contaminadas (KHAN FAISAL, 2004).

Sabe-se que há alguns micro-organismos que são capazes de utilizar hidrocarbonetos, tais como os do petróleo, como a única fonte de carbono. Entretanto, a degradação é lenta pois os micro-organismos precisam de determinadas condições para seu desenvolvimento, tais como a presença de nutrientes à base de nitrogênio e fósforo, pH e temperatura adequada (TORTORA, 2008). A produção de biossurfactantes também está relatada como um aspecto positivo para a degradação, já que melhora a dispersão do petróleo em água, aumentando a superfície de ação do micro-organismo (SWANNELL, 1996).

O solo contém uma grande variedade de micro-organismos, sendo a maior parte dos cultiváveis são fungos e bactérias heterotróficas. A variedade de micro-organismos depende das condições de umidade, pH e temperatura do solo<sup>8</sup>. Durante o ciclo de vida, os micro-organismos produzem e decompõem matéria orgânica, enriquecendo o solo e tornando-o cada vez mais propício para o crescimento e multiplicação de novos micro-organismos (ROBERTSON, 2007).

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Coleta de amostra

A amostra de petróleo foi doada pela refinaria Alberto Pasqualini – REFAP (Canoas/RS). As amostras de solo utilizadas para o isolamento dos micro-organismos foram obtidas em dois lotes. As primeiras amostras foram coletadas em vários locais do terreno da Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha (Novo Hamburgo/RS). O segundo lote foi coletado em vários locais em torno do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), localizado no Campus do Vale (Porto Alegre/RS).

### 2.2 Isolamento de micro-organismos

Para o isolamento de micro-organismos, foram adicionados em um erlenmeyer 1g de cada lote de solo (previamente homogeneizado) e 20g de petróleo. O sistema foi mantido em agitação por 7 dias (30°C, 200rpm). Após, alíquotas de 60µL dessa mistura foram removidos



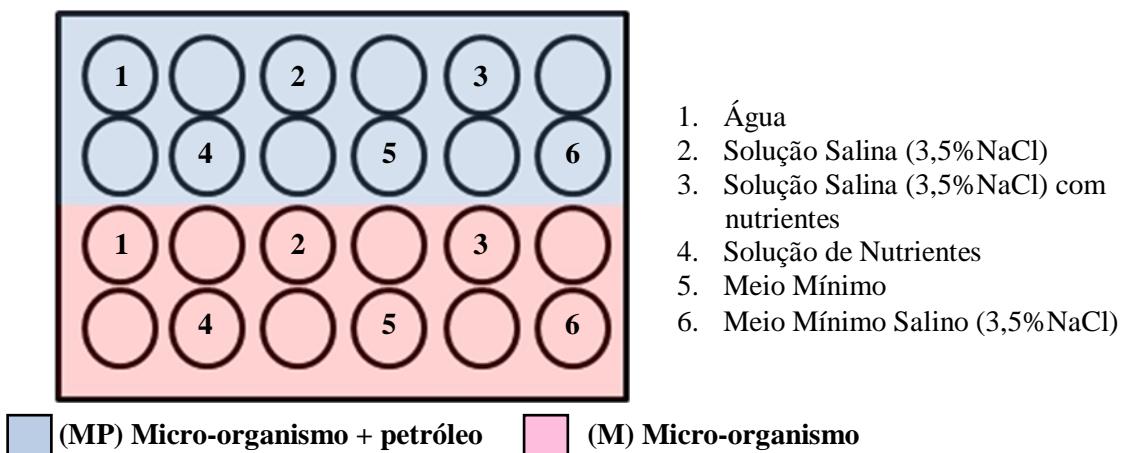
e adicionados por espalhamento em superfície à placas de petri contendo os meios de cultivo Luria-Bertani (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% cloreto de sódio) e Agar Batata Dextrose (20% infusão de batatas, 2% dextrose, 3% Agar). As placas foram incubadas em estufa por 5 dias (30°C) e as colônias obtidas foram selecionadas e isoladas por esgotamento em superfície.

#### 2.3 Teste prévio para seleção de cepas degradadoras de petróleo

O potencial degradador de petróleo dos micro-organismos isolados foi previamente testado por um teste rápido. Os micro-organismos foram inoculados em 6 meios de cultura diferentes, na presença ou na ausência de petróleo. Os meios de cultura utilizados foram: 1- Água; 2-Solução salina (3,5% NaCl); 3-Solução salina (3,5% NaCl) com nutrientes (0,1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,1% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>); 4- Solução de nutrientes (0,1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,1% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>); 5- Meio mínimo (0,2% glicose, 0,1% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5% peptona e 0,01% MgSO<sub>4</sub>); 6- Meio mínimo com salinidade (3,5% NaCl). Foi preparado um inóculo líquido inicial de 20 h de cada micro-organismo a ser testado com o meio de cultivo Luria-Bertani para as bactérias e GYMP para as leveduras (2% glicose, 0,5% extrato de levedura e 0,2% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Aproximadamente  $3,2 \times 10^{-7}$  células foram inoculadas em cada poço de uma placa polipropileno de 24 poços (Fig. 1). A contagem de células foi realizada por Câmara de Neubauer e por densidade ótica (DO) a 600nm. As placas foram incubadas em Shaker (90rpm) por 7 dias a 30°C.

Ao final do ensaio, a análise de dados foi feita pela análise visual da degradação e da solubilização do petróleo. Para a medida da DO, alíquotas de 100µl foram pipetadas de cada meio de cultivo e adicionadas à placas de 96 poços. A DO foi medida em aparelho específico a 630nm.

Figura 1 – Mapa da placa de 24 poços utilizada nos ensaios prévios para seleção de micro-organismos degradadores de petróleo



#### 2.4 Produção de Ramnolipídeos

A produção de ramnolipídeos foi analisada por um teste em placa utilizando o meio de cultivo azul de metíleno. As bactérias foram inoculadas por 24h em meio de cultivo Luria-Bertani (37°C) e as leveduras em GYMP (28°C).

Os micro-organismos foram repicados para o meio de cultivo azul de metíleno (1% peptona, 1% lactose, 0,2% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,0065% azul de metíleno) e incubados a 37°C



(bactérias) ou 28°C (leveduras) por 2 dias. Foi analisada a formação de halo em torno da colônia.

#### 2.5 Identificação dos micro-organismos

A primeira etapa da identificação das bactérias foi feita, inicialmente, pela coloração de Gram. Prepararam-se esfregaços bacterianos e foi realizada a adição seqüencial de soluções de violeta de genciana, lugol, álcool-acetona e fucsina. O resultado foi observado em microscópio. Para identificar as bactérias, o gene rRNA 16S será seqüenciado.

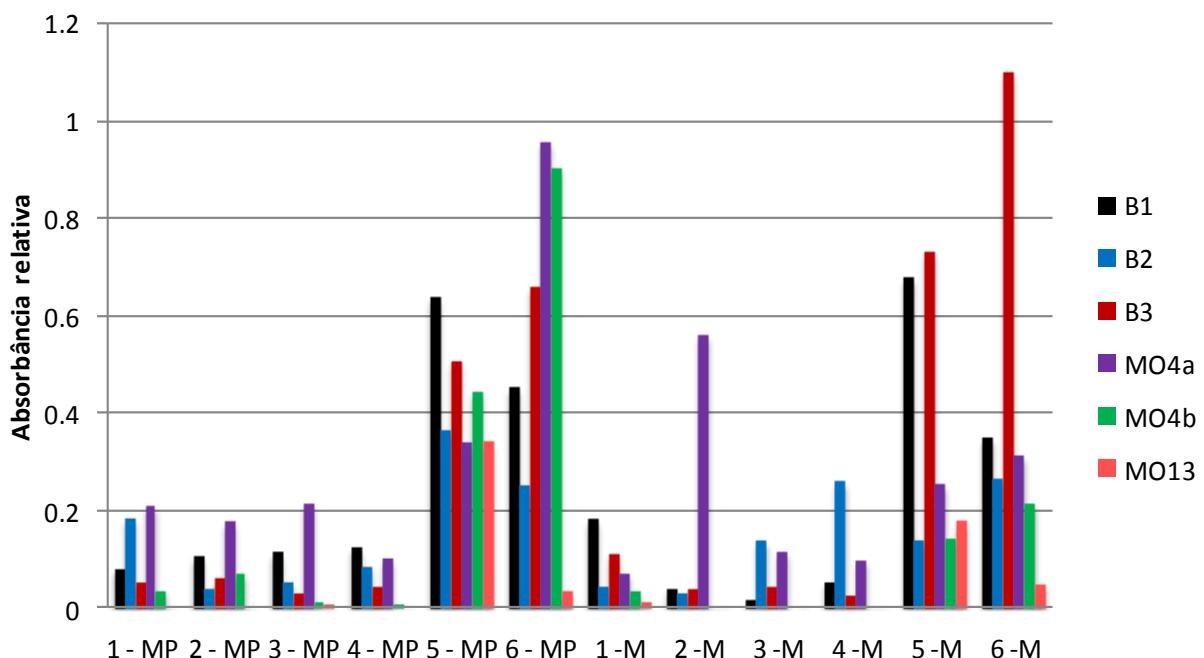
A identificação das leveduras foi feita pelo sequenciamento da região rRNA 26S.

### 3 Resultados e Discussão

A partir das amostras coletadas, foi observado o crescimento de diversos micro-organismos. Foram isoladas 19 colônias de micro-organismos resistentes ao petróleo, sendo 3 fungos leveduriformes, 1 fungo filamentoso e 15 bactérias.

O teste prévio para análise do potencial degradador de petróleo dos micro-organismos obtidos mostrou que algumas cepas não possuíam grande capacidade de desenvolvimento tendo petróleo como única fonte de carbono, crescendo somente em presença de glicose. Os micro-organismos B2, MO13, MO4a e MO4b apresentaram maior desenvolvimento no meio de cultivo contendo petróleo em relação ao cultivo controle (sem petróleo). A flecha azul indica o grande crescimento das cepas MO4a e MO4b no meio de cultivo salino (3,5% NaCl), indicando tolerância à salinidade semelhante a do mar (Fig. 2).

Figura 2 – Determinação da quantidade de células presentes nos meios de cultivo ao término do teste prévio de degradação de petróleo. MP: meio com adição de micro-organismo e petróleo; M: meio apenas com adição de micro-organismo. A absorbância foi quantificada em relação ao controle (que continha somente petróleo e meio).



A análise visual do teste prévio de seleção de cepas degradadoras de petróleo demonstrou que três leveduras (B1, B2 e B3) e uma bactéria (MO13) atacaram a gota de



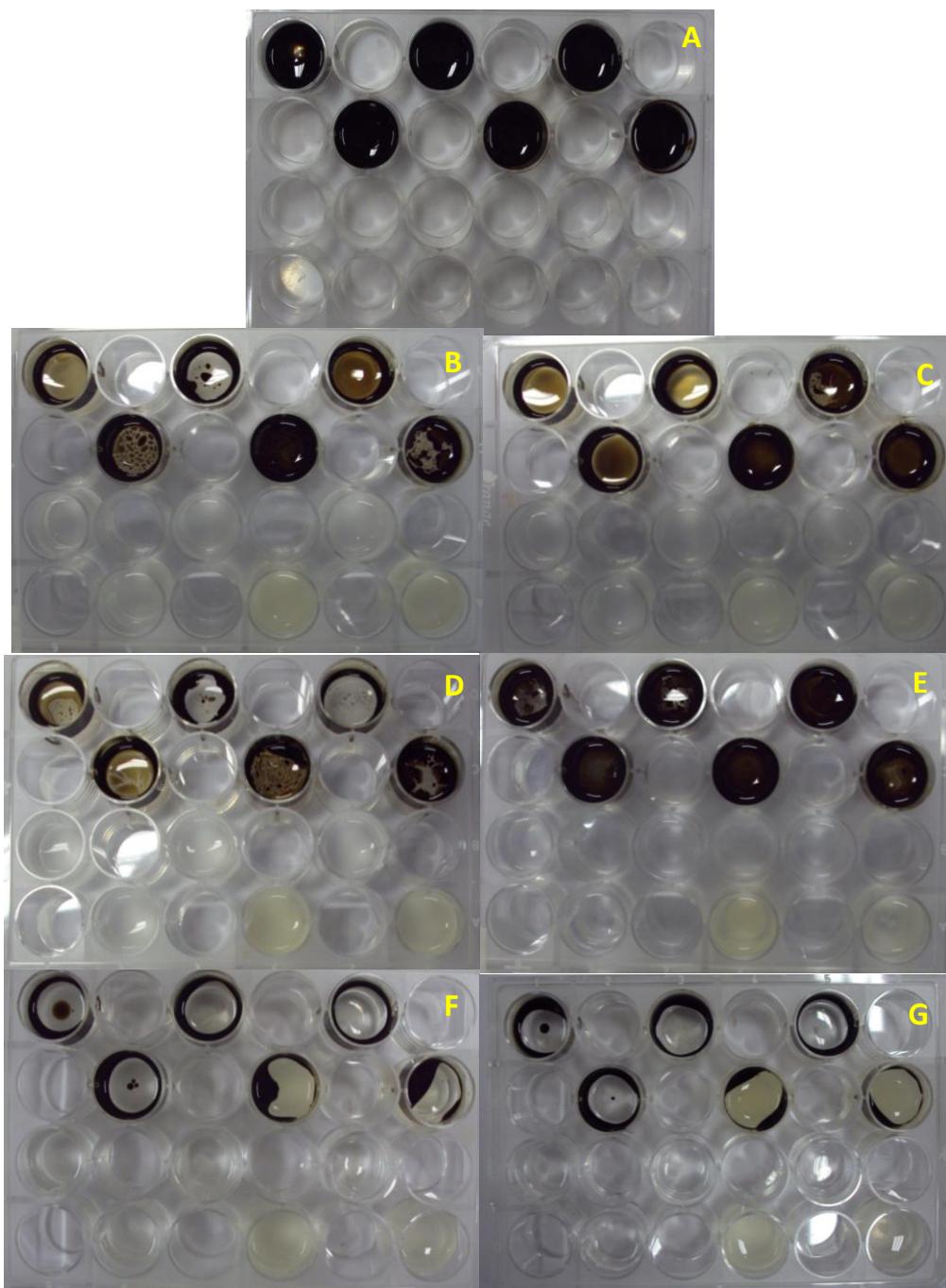
### 3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 25 a 27 de Abril de 2012

petróleo em todos os meios de cultivo, diminuindo a quantidade e causando visível solubilização dos hidrocarbonetos (Fig. 3). Este fato indica uma produção de biosurfactantes. Já as cepas MO4a e MO4b não apresentaram uma visível solubilização dos hidrocarbonetos, mas houve uma redução significativa da quantidade de petróleo em todos os meios de cultivo testados (Fig. 3).

As cepas selecionadas foram três bactérias (MO13, MO4a e MO4b) e três leveduras (B1, B2 e B3).

Figura 3 – Teste prévio de potencial de degradação dos micro-organismos selecionados. (A) Controle, sem adição de micro-organismo; (B) B1; (C) B2; (D) B3; (E) MO13; (F) MO4a; (G) MO4b.

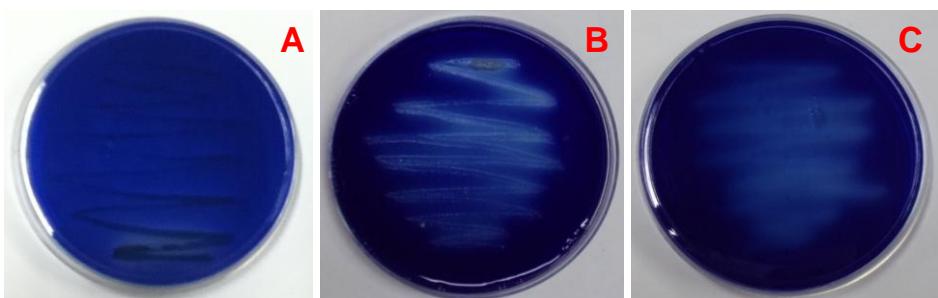


Os micro-organismos MO4a, MO4b e B2 apresentaram formação de halo ao redor da



colônia, indicando a produção de rhamnolípido (Fig. 4). Os rhamnolípídeos, biosurfactantes de baixo peso molecular, são frequentemente observados em micro-organismos degradadores de petróleo como alternativa para aumentar o acesso aos hidrocarbonetos (CAMEOTRA, 2009).

Figura 4 – Teste em placa de produção de rhamnolípido. (A) B2; (B) MO4a; (C) MO4b.



A coloração de gram revelou que as cepas MO13 e o MO4a tratam-se de estreptobacilos gram negativo e MO4b como um bacilo gram positivo (Fig. 5).

Até o momento, somente a cepa leveduriforme B1 foi identificada por seqüenciamento. A comparação da sequência obtida com o BLAST indicou que o micro-organismo é *Yarrowia Lipolytica*. Este micro-organismo é utilizado frequentemente em aplicações industriais e está descrito como degradador de hidrocarbonetos (AMARAL, 2007).

Figura 5 – Coloração de Gram. O aumento utilizado é 1000x. (A) MO4a; (B) MO4b; (C) MO13.



#### 4 Conclusão

Os micro-organismos selecionados possuem potencial para aplicações biotecnológicas, tanto na degradação de petróleo quanto na produção de biosurfactantes.

#### Referências

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). *Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis*. Rio de Janeiro, 2011.

AMARAL, P. F. F. **Produção de lipase de *Yarrowia Lipolytica* em biorreatador multifásico.** Tese de Doutorado em Ciências, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ. 2007, 220p.

CAMEOTRA, S. S.; SINGH, P. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. **Microbial Cell Factory**, 8:16, 2009.



### 3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 25 a 27 de Abril de 2012

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Oil in the Sea III: Inputs, Fates and Effects. **National Academy Press**, Washington, DC. 2003.

KHAN FAISAL, T.; HUSAIN, R. An overview and analysis of site remediation technologies, **J. Environmental Management**, 71, 2004. p. 95–122.

PETROBRÁS. **Petróleo, Energia e Tecnologia**. Brasil. 2010. Disponível em <<http://www.petrobras.com.br/pt/energia-e-tecnologia/fontes-de-energia/petroleo/>>. Acesso em 17/12/2011.

ROBERTSON, S.J.; MCGILL, W.B.; MASSICOTTE, H.B.; RUTHERFORD, P.M. Petroleum hydrocarbon contamination in boreal forest soils: a mycorrhizal ecosystems perspective. **Biological Reviews**, 82, p. 213-240, 2007.

SWANNELL, R.P.J.; LEE, K.; MCDONAGH, M. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. **Microbiological Reviews**, 60, P. 342–365. 1996.

TORTORA, Gerard J; FUNKE, Berell R; CASE, Christine L. **Microbiologia – Capítulo 12: Fungos, Algas, Protozoários e Parasitas Multicelulares**. 8<sup>a</sup> edição. Porto Alegre: 2008. Editora Artmed. P. 320-325

USEPA, 1996c. A citizen's guide to natural attenuation. Office of Solid Waste and Emergency Response, **US Environmental Protection Agency**. Publication EPA 542-F-96-015, Washington, DC.