

DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO E PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR BACTÉRIAS ISOLADAS A PARTIR DE SEDIMENTO DE UM MANGUEZAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Silva, A. M. F. D.^{1,2}; Maciel, A. B.^{1,3}; Medeiros, C. R.^{1,4}; Lugão, A. A. M.;
Wetler-Tonini, R. M. C.^{1,5}; Grativol, A. D.; Rezende, C. E.^{1,6}

1 – Laboratório de Ciências Ambientais, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro, 28.013 – 602
2- alineonline_pib@hotmail.com; 3- aryanemaciel@hotmail.com; 4- carol_medeiros@hotmail.com
5- micro_rita@yahoo.com.br ; 6- crezende@uenf.br

RESUMO

O objetivo do presente trabalho consistiu em isolar bactérias do sedimento de um manguezal, com capacidade para degradar petróleo e produzir biossurfactantes. O sedimento coletado foi diluído serialmente e plaqueado em meio para heterotróficos totais e em meio mineral contendo petróleo. Após o crescimento, as colônias foram contadas e, aquelas que cresceram nas placas contendo petróleo foram isoladas e testadas quanto à sua capacidade de produzir biossurfactantes pelo teste de colapso da gota. Parte do sedimento foi incubada com 2% de petróleo e o procedimento anterior foi repetido. Observou-se alteração numérica na comunidade microbiana após a incubação do sedimento com o poluente, bem como a ação seletiva do petróleo no meio de cultura utilizado, além disso, foi possível obter bactérias produtoras de biossurfactante a partir do sedimento do manguezal estudado, demonstrando o potencial destes organismos para uso em processos de biorremediação.

Palavras chave: biorremediação, microrganismo, colapso da gota.

INTRODUÇÃO

No estado do Rio de Janeiro, Brasil, os manguezais mais extensos são os encontrados na foz do rio Paraíba do Sul e nas baías de Guanabara, Sepetiba e Angra dos Reis (FEEMA, 1980; MENEZES *et al.*, 2000). Estes ecossistemas são sensíveis a distúrbios antrópicos, como a contaminação por petróleo ou de outros produtos tóxicos, que podem provocar danos a toda a biota, exercendo impacto por longo prazo (KREPSKY *et al.*, 2007; CURY, 2002).

Com a finalidade de minimizar o impacto ambiental causado pelo petróleo, foram desenvolvidas técnicas utilizando processos biológicos para remover estes compostos. Estas técnicas têm se destacado, pois são mais simples e apresentam maior eficiência e menor custo quando comparadas a métodos físicos e químicos. Estudos sugerem que as comunidades microbianas indígenas apresentam um potencial considerável para remediar sedimentos contaminados por óleo (YU *et al.*, 2005).

A sorção dos componentes hidrofóbicos do petróleo às partículas de sedimento dos manguezais limita sua biodisponibilidade aos microrganismos indígenas, reduzindo a eficiência da biorremediação (KREPSKY *et al.*, 2007). Algumas bactérias, no entanto, possuem a capacidade de produzir biossurfactantes, compostos com características de detergência, que podem emulsificar o óleo, facilitando a degradação, indicando seu potencial para remediar este tipo de poluição (KREPSKY *et al.*, 2007; NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Diante disto, o presente trabalho apresentou como objetivo isolar bactérias do sedimento de um manguezal que apresentem capacidade para degradar petróleo e produzir biossurfactantes.

MATERIAL E MÉTODOS

A área de estudo foi o manguezal do estuário do rio Paraíba do Sul, com aproximadamente 800 ha, considerado o maior manguezal da região Norte Fluminense. Este localiza-se no município de São Francisco do Itabapoana (21°28'25"S e 41°07'12"O) (BERNINI & REZENDE, 2004).

A amostra de sedimento foi coletada a partir da camada superficial (0 a 5 cm) em 18 pontos aleatórios, formando uma amostra composta. A seguir, o material foi resfriado e levado para o Laboratório de Ciências Ambientais da UENF para processamento.

Parte da amostra foi congelada e enviada para o laboratório da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ) para análises de hidrocarbonetos no sedimento coletado.

Foram realizados dois tratamentos com o sedimento, um antes da incubação com petróleo (VA) e outro após a incubação (VD). No primeiro tratamento, uma alíquota de dez gramas de sedimento foi incubada com tampão fosfato sob agitação a $\pm 28^\circ\text{C}$ durante 28 dias, e 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 (LI *et al.*, 2000) e placas com meio mineral com ágar bacteriológico acrescido de 0,5% de petróleo como única fonte de carbono (LI *et al.*, 2000 modificado). As colônias foram contadas após 48h de incubação a 37°C . No segundo tratamento, outros dez gramas de sedimento foram incubados em meio mineral com 2% de petróleo até a degradação visual do mesmo, repetindo-se, então, o procedimento descrito acima.

As colônias que cresceram nas placas com petróleo em ambos os tratamentos foram isoladas em placas com ágar nutriente. A seguir, transferidas para tubos com TSB (Triple Soy Broth) e incubadas a 37°C por 24h. A visualização das bactérias foi feita em lâminas a fresco com o auxílio de microscópio óptico. A seguir 100 μL da solução bacteriana em TSB foram transferidos para tubos contendo 3mL de meio mineral acrescido de glicose a 1%. Após incubação por 24h a 37°C os inóculos foram padronizados para densidade 2 com o cartão de Wickerham (TOSTA, 2004). A seguir, 500 μL das soluções padronizadas foram inoculados em Erlenmeyers com 9,5mL de meio mineral com 2% de glicose. Após 72h de crescimento a 37°C , realizou-se o teste de colapso da gota, onde 100 μL das suspensões foram inoculados em "poços" de placas de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) preenchidos com 50 μL 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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar o nível de contaminação de sedimentos por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) utilizou-se os limites propostos pela NOAA, que baseia-se no índice TEL (Threshold Effect Level), o qual não pode ultrapassar 1.684 ng g^{-1} para o somatório de HPAs. De acordo as análises realizadas pela PUC-RJ, no sedimento do manguezal estudado há predomínio de HPAs de fontes de combustão ou de biomassa não havendo HPAs de origem petrogênica.

A contagem de microrganismos nas placas de heterotróficos totais apresentou valores de 10^9 a 10^{11} UFC. g^{-1} para a amostra antes da incubação com petróleo (VA), e 10^8 a 10^{10} UFC. g^{-1} de sedimento para a amostra após a incubação com o poluente (VD) (Fig. 1a). Para as placas contendo petróleo, obteve-se contagens entre 10^6 e 10^9 UFC. g^{-1} de sedimento para VA, e entre 10^7 e 10^{10} UFC. g^{-1} de sedimento para VD (Fig. 1b).

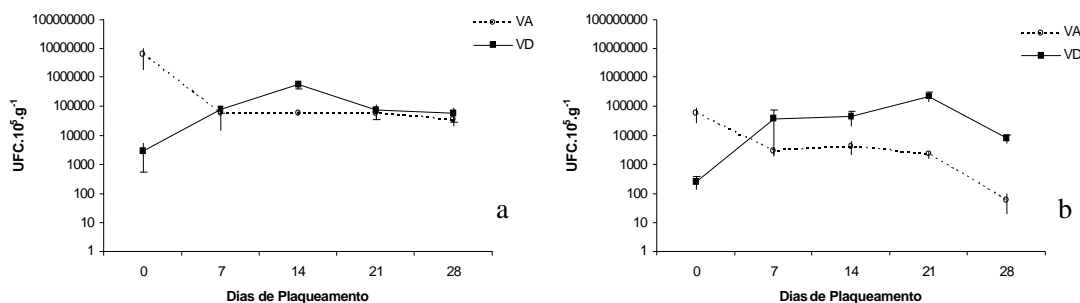


Figura 1: a) Médias e respectivos desvios-padrão das contagens de microrganismos cultivados em placas contendo meio de cultura para heterotróficos totais antes (VA) e depois (VD) da incubação do sedimento com petróleo; b) Médias e respectivos desvios-padrão das contagens de microrganismos cultivados em placas contendo meio de cultura para degradadores de petróleo antes (VA) e depois (VD) da incubação do sedimento com petróleo.

Foi realizada uma ANOVA a fim de verificar diferenças nas contagens das colônias, obtendo-se $p=0,030$ $F(3,76)=3,12$. O teste de Duncan demonstrou diminuição significativa no número de heterotróficos após a incubação com o petróleo. Esta diferença não foi encontrada quando comparamos as contagens de degradadores de petróleo antes e depois do contato com o poluente.

Houve diferença nas contagens de acordo com o tipo de meio de cultura utilizado, com maior número de heterotróficos em relação ao de degradadores de petróleo antes da incubação do sedimento; esta diferença deixa de ser observada após a incubação com o poluente, uma vez que a comunidade de heterotróficos foi reduzida, demonstrando que o impacto do petróleo sobre a comunidade microbiana indígena pode ter selecionado apenas os microrganismos degradadores.

Segundo SANTOS (2004), a presença do contaminante pode causar o aumento das populações de microrganismos capazes de se adaptarem às novas condições e a diminuição daquelas que são sensíveis ao poluente. De acordo com ZHOU *et al.* (2009), tanto a concentração, quanto o tempo de exposição aos HPAs causam redução da diversidade, sugerindo que a comunidade do sedimento foi afetada pela contaminação.

Foram isoladas 112 colônias, das quais, 59 produziram biosurfactante (aproximadamente 53%). Esses dados comprovam os resultados de TUGRUL & CANSUNAR (2005), que utilizaram a mesma metodologia para demonstrar a capacidade de produção de biosurfactantes 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 para a sobrevivência destes organismos em ambientes contaminados.

CONCLUSÕES

Pôde-se concluir que o petróleo exerce atividade seletiva sobre a comunidade microbiana do manguezal estudado e que as bactérias indígenas do sedimento possuem capacidade de produzir biosurfactante, possuindo aplicabilidade em processos de biorremediação.

REFERÊNCIAS

- BERNINI, E.; REZENDE, C. E. 2004. Estrutura da vegetação em florestas de mangue do estuário do rio Paraíba do Sul, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta Botanica Brasiliensis*, v. 18, n.3, p. 491-502.
- BODOUR, A. A.; DREES, K. P.; MAIER, R. M. 2003. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 6, p. 3280–3287.
- CURY, J. C. 2002. Atividade microbiana e diversidade metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo. *Dissertação de mestrado*, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP. 95p.
- FEEMA. 1980. *Relatório técnico sobre manguezal*. RT 1123, 61p.
- KREPSKY, N., DA SILVA, F.S., FONTANA, L.F. & CRAPEZ, M.A.C. 2007. Alternative methodology for isolation of biosurfactant-producing bacteria. *Brazilian Journal of Biology*, 67(1): 117-124.
- LI, G.; HUANG, W.; LERNER, D. N. & ZHANG, X. 2000. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. *Water Research*. 34. 3845-3853.
- MENEZES, L.F.T., PEIXOTO, A.L. & MACIEL, N.C. 2000. A riqueza ameaçada dos manguezais. *Ciência Hoje*, 27(158):63-67.
- Falta Michel et al., 2000
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. 2002. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. *Química Nova*, v. 25, nº 5, p. 772 – 776.
- SANTOS, A. C. F. 2004. Utilização do tolueno como única fonte de carbono por microrganismos Isolados de um Landfarming. Monografia *de Graduação*, Universidade Estadual de Santa Cruz, BA.

TOSTA, C. D. 2004. Biotipagem de leveduras industriais através do sistema killer. **Dissertação de mestrado**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP.

TUGRUL, T. & CANSUNAR, E. 2005. Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 21: p. 851–853.

YU, S. H.; KE, L.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Y. 2005. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. **Environment International**, n. 31, p. 149-154.

ZHOU, H. W.; Wong, A. H. Y.; YU, R. M. K.; PARK, Y. S.; TAM, N.F.Y. 2009. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced Structural Shift of Bacterial Communities in Mangrove Sediment. **Microbial Ecology**, v. 58, p. 153–160.