

AVALIAÇÃO DA BIODECOMPOSIÇÃO DE ÓLEO BRUTO E DIESEL ATRAVÉS DA *PSEUDOMONA AERUGINOSA*.

J. D. A. CÂMARA¹, M. A. S. B. SOUSA¹ e A. M. LIMA²

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia Química

² Universidade Federal de Sergipe, Laboratório de Biotecnologia Ambiental

E-mail para contato: jessicacamara.eq@gmail.com

RESUMO – Devido ao crescente uso de combustíveis fósseis, a contaminação do solo por hidrocarbonetos tem aumentado, provocando desequilíbrio ambiental. Esse estudo visa avaliar o potencial de biodegradabilidade do gênero *Pseudomonas* isoladas a partir de areia de filtro de piscina, em soluções contendo concentrações de óleo bruto e diesel. Foram utilizados microcosmos contaminados com quantidades conhecidas de óleo bruto (OB) e diesel (D), 2,50% p/p, utilizando 2,00 kg de massa de solo, para determinação de sua capacidade de biorremediação com e sem a adição de bactérias. Os dados obtidos para remoção dos contaminantes foram 45,36 % (OB) e 48,51 % (D), nos ensaios sem adição de bactérias e de 63,50 % (OB) e 75,47 % (D) nos testes com adição de bactérias. Com os dados obtidos ao longo da pesquisa, foi possível concluir que o uso do grupo *Pseudomonas* isolados apresentaram resultados promissores em relação a capacidade de degradação para esses contaminantes em um curto intervalo de tempo.

1. INTRODUÇÃO

O crescente avanço da tecnologia vem demandando uma quantidade cada vez maior de recursos naturais, o que causa um desequilíbrio no meio ambiente, seja pelo uso indiscriminado ou pela introdução de produtos químicos em determinados locais. Um dos grandes problemas é o derramamento de petróleo e seus derivados, que têm contribuído para a contaminação do solo com hidrocarbonetos em todo planeta. Isso é causado principalmente pelas atividades de extração, transporte e refinamento. De acordo com Souza *et al.* (2010), observa-se que, os casos de contaminação do solo e água por hidrocarbonetos derivados de petróleo, que mesmo em pequenas concentrações podem constituir um grande perigo à saúde humana e ao meio ambiente.

Os métodos tradicionais, como a contenção e recolhimento através de barreiras flutuantes e a adsorção por materiais naturais ou sintéticos, não se apresentam como um método efetivo, pois estes não promovem a degradação do petróleo. A biorremediação, uma técnica natural, consiste na utilização de grupos microbianos capazes de degradar hidrocarbonetos. Esses microrganismos possuem a capacidade de biotransformar moléculas poluentes em nutrientes para a realização de suas funções metabólicas e fisiológicas.

A biorremediação baseia-se em três aspectos principais: a existência de microrganismos com capacidade catabólica para degradar o contaminante; a disponibilidade do contaminante ao ataque

microbiano ou enzimático e condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade do agente biorremediador. (Pereira e Lemos, 2005; Pasumarthi *et al.*, 2013). Nesse sentido, uma das técnicas mais estudadas atualmente é a biodegradação, que utiliza grupos microbianos capazes de degradar hidrocarbonetos. Este método torna-se efetivo, uma vez que, o petróleo é usado como fonte de carbono através dos processos microbianos, resultando na quebra das moléculas em compostos de baixa massa molecular (Zang *et al.*, 2005).

Porém, existe um fator que limita a biodegradação dos poluentes; segundo Kronenberg (2007) é a limitada disponibilidade destes compostos aos microrganismos, já que hidrocarbonetos geralmente se agregam aos componentes do solo, dificultando sua remoção ou degradação. E como a biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos depende da capacidade de assimilação desses compostos pelos microrganismos, há a necessidade da utilização de microrganismos que crescem na presença de contaminantes oleosos produzindo biossurfactantes.

A bioaumentação envolve a inoculação do solo com culturas puras ou consórcio microbiano contando microrganismos selecionados para degradação de contaminantes específicos. Esse processo tem sido estudado para vários herbicidas, hidrocarbonetos clorados e carbamatos através do emprego de populações nativas aclimatadas, isolados selecionados. Em geral, a bioaumentação é mais apropriada para tratamentos de contaminantes muito recalcitrantes, em contaminações recentes e onde se pretende aplicar a degradação acelerada (Moreira e Siqueira, 2002).

Uma das substâncias produzidas por microrganismos que utilizam o carbono presente nos derivados de petróleo e no óleo bruto é o biossurfactante, moléculas que possuem uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica, provocando a separação de interfaces com diferentes graus de polaridade, tais como as interfaces óleo/água. Essa propriedade aumenta a solubilidade e a disponibilidade de poluentes hidrofóbicos aos microrganismos, aumentando o potencial de biodegradação.

Um dos compostos biossurfactantes mais investigados são os ramnolipídeos, produzidos pelo grupo *Pseudomonas*, nesse grupo a *Pseudomona aeruginosa*, bactéria Gram-negativa, pode ser isolada de diferentes habitats incluindo a água, o solo e plantas, é um patógeno oportunista humano que causa infecções nosocomial sérias e também é resistente a antibióticos. Sob condições ambientais específicas esta bactéria produz um biossurfactante contendo ramnose – glicolipídio. O tipo e a proporção do ramnolipídeo produzido dependem da cepa, da fonte de carbono utilizada e das condições de cultivo (Fontes *et al.*, 2008).

O objetivo deste estudo é avaliar o potencial de biodegradabilidade do gênero *Pseudomonas* isoladas a partir de areia de filtro de piscina, em soluções contendo concentrações de óleo bruto (petróleo) e diesel.

2. METODOLOGIA

A amostra de petróleo utilizada foi coletada no campo de Fazenda Belém que localiza-se na porção noroeste da Bacia Potiguar emersa, leste do Estado do Ceará, nos municípios de Aracati,

Icapuí e Jaguarana, cerca de 160 km a sudeste de Fortaleza. O material utilizado para desenvolvimento dos microrganismos foi areia de filtro de piscina de um condomínio residencial. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Engenharia Ambiental e Controle de Qualidade no Departamento de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – LEACQ/DEQ/UFRN. O desenvolvimento desse estudo seguiu a sequência descrita no fluxograma apresentado na Figura 1.

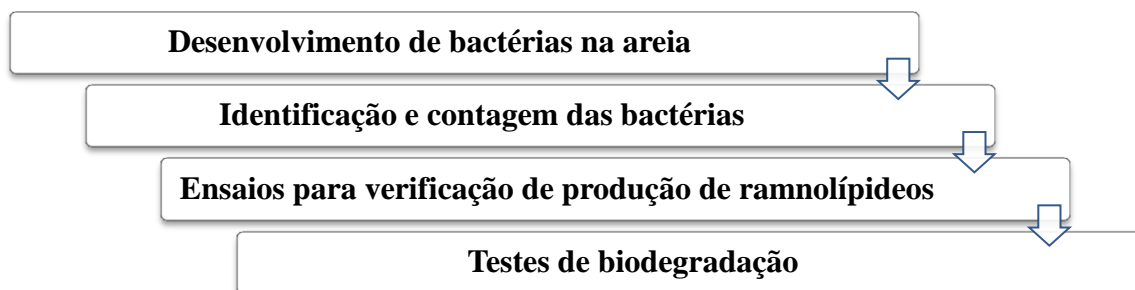


Figura 1 – Fluxograma das etapas adotadas no experimento.

2.1. Desenvolvimento das bactérias

As bactérias utilizadas nos ensaios de biodegradação foram obtidas através de um processo de adaptação em ambiente contaminado de forma controlada. Utilizou-se 1,50 kg de areia de filtro de piscina, a qual foi acondicionada em bandejas plásticas, e enriquecida com uma solução petróleo/diesel de 2,50 g.L⁻¹, de modo que ficassem com uma concentração de 2% v/m. O solo também foi umedecido com uma solução nutritiva com a seguinte composição: KH₂PO₄ 0,36 mg.L⁻¹; MgSO₄ 0,12 mg.L⁻¹, CaCl₂ 0,11 mg.L⁻¹; NH₄NO₃ 0,08 mg.L⁻¹ e MgNO₃ 0,086 mg.L⁻¹; com concentração idêntica a anterior: 2 % v/m. Durante 25 dias foi promovido, em intervalos regulares de cinco dias, a aeração e a exposição ao sol das bandejas que continham o solo. Nesse período, amostras de 1 g de areia foram recolhidas para as análises bacteriológicas para identificação e quantificação do gênero *Pseudomonas*.

2.2. Identificação e quantificação bactérias

Para identificação e quantificação utilizou-se erlenmeyers de 125 mL para acondicionamento de amostras de 1 g de areia diluídas em 100 mL de água destilada. Esse sistema foi submetido à agitação de 200 rpm por 24 horas. Após as 24 horas o líquido foi submetido a diluição seriada e inoculadas nos meios de cultura qualitativo Acetamide Agar e no quantitativo Cetrimide Agar, ambos meios seletivos para as *Pseudomonas aeruginosa*. Os meios de cultura com as amostras foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 48 h. Após a incubação foi realizada a contagem na placa de colônias formadas e o resultado expresso em Unidade Formadora de Colônia por mililitro de amostra (UFC/mL), de acordo com a Equação 1.

$$UFC/mL = \frac{n^{\circ} \text{ de colônias}}{\text{fator de diluição da placa}} \quad (1)$$

2.3. Ensaios para verificação de produção de ramnolipídeos

As colônias desenvolvidas foram repicadas e transferidas para um pré-inóculo com uma solução nutriente de peptona 2% em massa, onde permaneceram no *shaker* em agitação de 200 rpm e 30 °C durante 24 horas.

Nos ensaios de fermentação utilizou-se como meio líquido para a avaliação da produção de biossurfactante e do crescimento celular, o meio mineral descrito por Robert *et al.* (1989), composto de NaNO_3 7,00 g.L⁻¹, KCl 0,10 g.L⁻¹, KH_2PO_4 0,50 g.L⁻¹, K_2HPO_4 g.L⁻¹, CaCl_2 0,01 g.L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,50 g.L⁻¹, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g.L⁻¹, Extrato de levedura 0,10 g.L⁻¹, utilizando glicerina como fonte de carbono nas concentrações de 2 e 10%. Após ajuste de pH para 7,0, quando necessário, o meio de cultivo foi esterilizado a 121°C e 1 atm por 15 minutos.

Os ensaios de fermentação utilizou de 50 mL do meio descrito acima em erlenmeyers de 125, inoculados com 1 mL do pré-inóculo (suspensão celular de *Pseudomonas aeruginosa*). Os erlenmeyers foram acondicionados em mesa agitadora, a 30°C e 200 rpm, mantidos durante 13 dias (312 horas), com amostragens realizadas a cada 2 horas nas primeiras 8 horas e depois a cada 24 horas para análise de crescimento celular, produção de ramnose.

A produção do ramnolipídeo foi quantificada através de análises colorimétrica em termos de concentração de ramnose produzida no meio de cultivo, através da análise de 6-deoxihexose (Chandrasekaran e Bemiller, 1980 *apud* Zang *et al.*, 2005). O procedimento consiste em adicionar ao um tubo de ensaio adicionar 1 mL da amostra contendo ramnose juntamente com 4,50 mL da solução A (90 mL de H_2SO_4) e incubar por 10 minutos a 100°C. Após a solução atingir a temperatura ambiente, adicionar 0,1 mL da solução B (0,2 mL de ácido tioglicólico e 5,8 mL de água destilada), homogeneizar os tubos e guardar em local com ausência de luz por três horas. Passado esse tempo, deve-se realizar a leitura de absorvância a $\lambda=400$ nm e $\lambda=430$ nm no espectrofotômetro UV visível. Na determinação da concentração de ramnose das amostras retiradas, 20 mL de cada amostra foram centrifugados por 40 min a 3500 rpm, separou-se o sobrenadante e a partir deste realizou-se o mesmo procedimento citado anteriormente. A equação foi utilizada para a conversão dos dados de absorvância à concentração equivalente.

2.3. Ensaios de biodegradação

O teste de acompanhamento do processo de biodegradação foi realizado em microcosmos (Figura 2) semelhantes aos utilizados na etapa de desenvolvimento das bactérias em solo. Nesse processo utilizou-se 2 kg de areia aplicando 50 g de cada contaminante (óleo bruto e diesel) simulando uma contaminação no ambiente, ocorrendo a mistura com o auxílio de bastão de vidro. Para cada hidrocarboneto foram utilizadas duas bandejas onde foram inoculados com 50 mL de caldo contendo *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando a sequência de preparação de inóculo descrito no item 2.2 e um experimento sem a adição de microrganismo para cada contaminante.



Figura 2 - Microcosmos utilizados para o ensaio de biorremediação. A) Contaminado com óleo bruto B) Contaminado com diesel.

Na avaliação da remoção de teor de óleo e graxas foram realizadas três amostragens ao longo de 28 dias. O teor de óleos e graxas (hidrocarbonetos) na areia durante o processo de biorremediação foi quantificado por método de extração contínua em aparelho tipo Soxhlet (Extrator de Óleos e Graxas Marconi MA-491) em 5 gramas de amostras. Os valores para os percentuais foram calculados pelas Eq. 2 e 3.

$$\%O\&G = \frac{m_{\text{óleo}}}{m_{\text{amostra}}} * 100 \quad (2)$$

$$\%RO\&G = \left(1 - \left(\frac{C_f}{C_i} \right) \right) * 100 \quad (3)$$

Onde:

%O&G – porcentagem de óleos e graxas;

m – massa em gramas (g);

%RO&G – porcentagem de remoção de óleos e graxas;

C_f – percentual de óleos e graxas da amostra no tempo final de biorremediação;

C_i – percentual de óleos e graxas da amostra no tempo inicial de biorremediação

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Acompanhamento do desenvolvimento de *Pseudomonas* no solo

Durante 25 dias foi analisado, tanto quantitativamente como qualitativamente, a presença de bactérias do tipo *Pseudomona aeruginosa* em solo contaminado manualmente. O resultado pode ser observado na Figura 3.

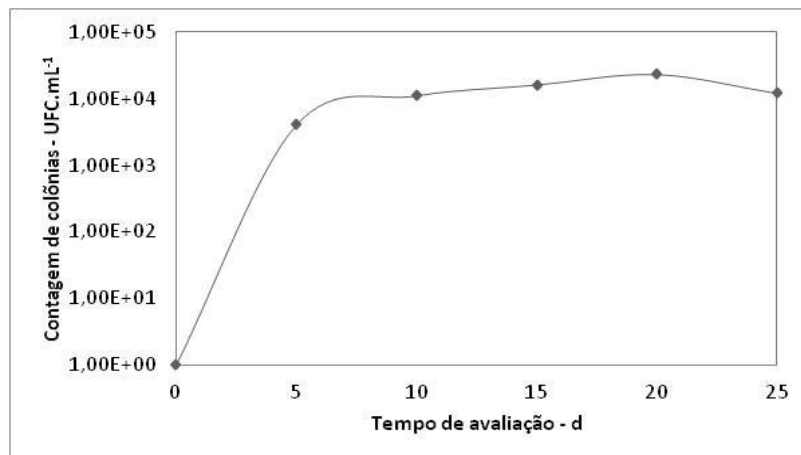


Figura 3 - Quantificação das bactérias desenvolvidas na areia contaminada com petróleo/diesel.

Pode-se observar que ocorreu um crescimento da quantidade de colônias ativas até o vigésimo dia. Portanto, apenas durante o período de desenvolvimento das bactérias é que as colônias foram repicadas e preservadas.

3.2. Avaliação da produção de biossurfactante

Ao analisar a produção de biossurfactante durante o crescimento em glicerina, nas duas concentrações estudadas, observou-se uma baixa produção do tensoativo em baixas concentrações de carbono. Utilizando a concentração 2% de glicerina houve um pico de 5,14 mg.L⁻¹ de ramnose no tempo de 72 h, seguido pelo decaimento da sua concentração, o que pode indicar um provável consumo do produto por parte da bactéria quando o substrato passou a ter concentrações reduzidas.

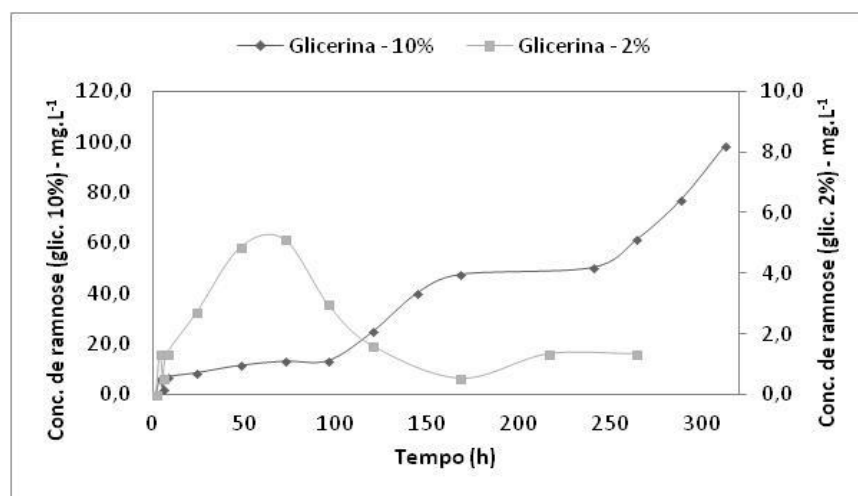


Figura 4 – Avaliação da produção de ramnose utilizando glicerina como fonte de carbono nas concentrações de 2% e 10%.

Como se pode observar na Figura 4, diferente do que ocorreu quanto foi empregada uma baixa concentração de carbono, o aumento da concentração do substrato permitiu uma elevada produção do biossurfactante, que atingiu um valor de $98,87 \text{ mg.L}^{-1}$ de ramnose ao final do tempo de fermentação. Porém, esta ainda encontrava-se em fase de aumento da concentração, indicando que, caso a fermentação continuasse, poderia se conseguir valores mais elevados.

3.2. Ensaios de biodegradação

As Figuras 5 e 6 apresentam o percentual de Óleos & Graxas durante o processo de biorremediação (bioaumentação e atenuação natural) do solo contaminado com óleo bruto e com diesel.

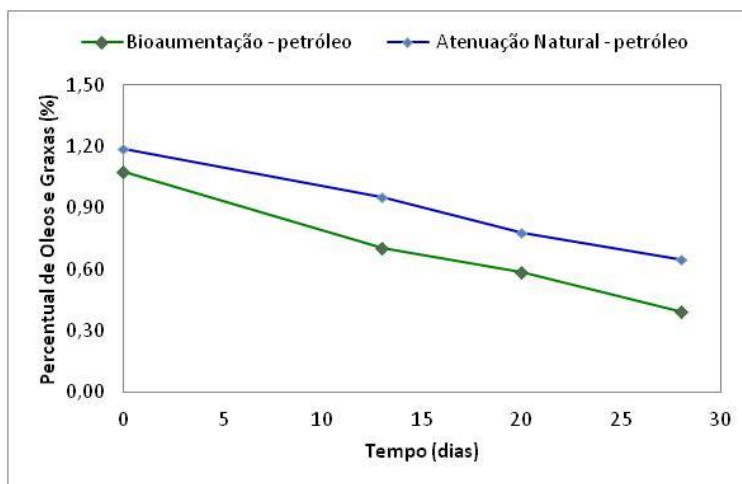


Figura 5 - Porcentagem de petróleo presente no solo.

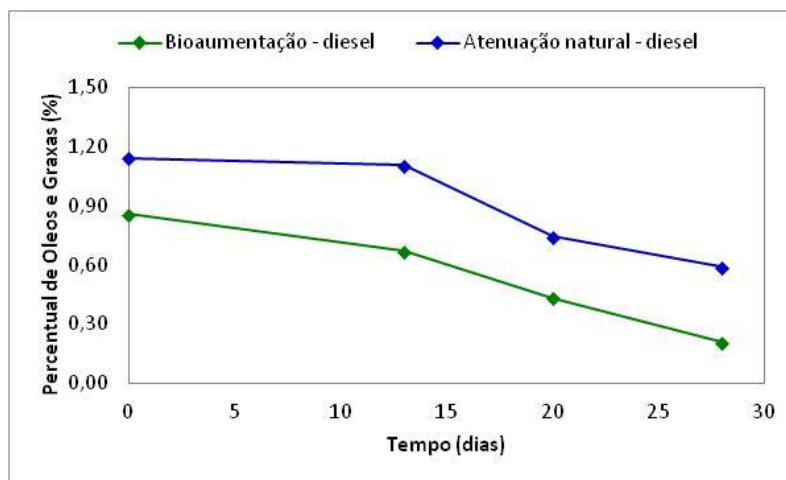


Figura 6 - Porcentagem de diesel presente no solo.

Na tabela 5 abaixo se encontram os resultados para a taxa de remoção para o período total de

análise (28 dias).

Tabela 1 - Resultados da remoção de óleos e graxas.

% de remoção de Óleos e Graxas (%RO&G)		
Composto	Tipo de Biorremediação	%RO&G
Óleo bruto	Bioaumentação	63,50%
Óleo bruto	Atenuação Natural	45,36%
Diesel	Bioaumentação	75,47%
Diesel	Atenuação Natural	48,51%

Verifica-se na Tabela 1 que o diesel foi o composto mais facilmente removido, independentemente do processo de biorremediação usado. Sendo os resultados do processo de bioaumentação significativamente superiores, tanto para o óleo bruto como para o diesel.

O fato de o diesel apresentar melhores resultados, quando comparado ao óleo bruto, pode ser explicado por este apresentar estruturas orgânicas mais simples (hidrocarbonetos cuja cadeia contém de 10 a 50 átomos de carbono), mais facilmente biodegradáveis do que os hidrocarbonetos do óleo bruto (mistura complexa de hidrocarbonetos e de impurezas, como enxofre, nitrogênio, metais, oxigênio e outros).

4. CONCLUSÕES

A bactéria *Pseudomona aeruginosa* isolada neste estudo, apresentou capacidade de produzir ramnose com valores de 5,14 mg.L⁻¹ e 98,87 mg.L⁻¹, para concentrações e glicerina 2% e 10%, respectivamente, indicando a capacidade produzir biossurfactante.

Ao testar a capacidade do microrganismo na remediação de solos contaminados, no ensaio de bioaumentação este apresentou remoções de 63,50% (petróleo) e 75,41% (diesel), mais elevadas que as remoções observadas na atenuação natural, 45,36% (petróleo) e 48,71% (diesel) indicando que os microrganismos adicionados ao meio contaminado utilizou os hidrocarbonetos presentes como fonte de carbono em 28 dias de avaliação.

5. REFERÊNCIAS

FONTES, G.C.; AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A.Z. Produção de biossurfactante por levedura. *Quim. Nova*, v.31, n. 8, p.2091-2099, 2008.

KRONEMBERGER, F.A; SANTA ANNA, L.M.M.; MENEZES, R.R.; FERNANDES, A.C.L.B.; BORGES, C.P.; FREIRE, D.M.G. Controle da Oxigenação na Produção de Biossurfactantes em Biorreator, SINAFERM, Curitiba-PR, 2007.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. Lavras: Ed. UFLA, 2002.

PASUMARTHI, R.; CHANDRASAKARAN, S.; MUTNURI, S. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia fergusonii* isolated from the Goan coast. *Marine Pollution Bulletin*, 76, 276-282, 2013.

PEREIRA, L. T. C.; LEMOS, J. L. S. Degradação de hidrocarbonetos de petróleo por *Aspergillus Niger* e *Penicillium Corylophilum*. Disponível em: <http://www.scielo.com.br/>. Acesso em: out. 2013.

ROBERT. M.; MERCADÉ, M.E.; BOSH, M.P.; PARRA, J.L.; ESPUNY, M.J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnol. Lett.*, v.11, n.12, p. 871-874, 1989.

SOUZA, D. B.; BRITO, G. C. B.; VANCONCELOS, F. C. W.; BRAGA, L. C. Estudo de micro-organismos presentes em uma área contaminada por gasolina comercial. *Revista de estudos ambientais*, Blumenau, v. 12, n. 2, p. 38-46, 2010.

ZANG, G.; WU, Y.; QIAN, X.; MENG, Q. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, Hangzhou, v.6B, n.8, p.725-730, 2005.

ZHANG, Y.; MILLER, R. M. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6): 2101–2106, 1994.