

2.12.01 - Microbiologia / Biologia e Fisiologia dos Microorganismos

AValiação DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR MICRORGANISMOS ISOLADOS DE BIORREATOR DE BATELADA ALIMENTADA PARA TRATAMENTO DE BORRAS OLEOSAS

Maria Clara Bessa Souza¹, Augusto Lázaro dos Santos², João Vitor Torquato de Souza³, Iago Souza Bieniek⁴, Eric de Lima Silva Marques⁵, Bianca Mendes Maciel⁶, Rachel Passos Rezende⁷

1. Estudante de Biomedicina da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC
2. Estudante de Biomedicina da UESC
3. Estudante de Biomedicina da UESC
4. Estudante de Biomedicina da UESC
5. Pós doutor do Programa de Pós Graduação de Biologia e Biotecnologia de Microorganismos da UESC
6. Professora/Pesquisadora da UESC – Departamento de Ciências Biológicas
7. Professora/Pesquisadora da UESC - Departamento de Ciências Biológicas/Orientadora

Resumo

O petróleo é uma das principais fontes de recursos naturais que movem a economia, no entanto, o risco de ocorrência de acidentes de derramamento em sua cadeia produtiva impulsiona a busca de métodos para conter contaminações ambientais. Biossurfactantes têm sido estudados na aplicação de técnicas de biorremediação por sua capacidade de solubilização de compostos hidrofóbicos e de promover aumento da taxa de biodegradação nestes sistemas. Nesse trabalho isolou-se microorganismos presentes em biorreator de batelada alimentada, contendo solo de Landfarm de borras oleosas, e avaliou-se a produção de biossurfactantes em testes utilizando óleo contaminante das praias do Nordeste do derramamento de 2019. 21 dos 27 isolados testados nesse estudo apresentaram resultados promissores, sendo estes em sua maioria bacilos gram negativos, além disso, o consórcio microbiano completo apresentou uma elevada e imediata taxa de biodegradação do óleo bruto demonstrando elevado potencial biotecnológico.

Palavras-chave: biorremediação, petróleo, derramamento de óleo.

Apoio financeiro: CNPq.

Trabalho selecionado para a JNIC: Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC).

Introdução

O petróleo é uma das principais fontes de recursos naturais que movem a economia mundial. Sua presença marcante no dia-a-dia do ser humano fez com que o mundo se tornasse cada vez mais dependente de seus derivados para a manutenção das atividades. Ao longo do tempo, a tecnologia de exploração, refino, transporte e operações de armazenamento do petróleo e seus derivados foram aprimoradas. No entanto, em nessas etapas derramamentos acidentais podem ocorrer ocasionando contaminações ambientais potencialmente graves.

A possibilidade da ocorrência de acidentes de derramamento na cadeia produtiva do petróleo impulsiona a pesquisa de novas metodologias para conter a contaminação ao meio ambiente. Nesse contexto, a biorremediação apresenta-se como uma excelente proposta. Essa técnica pode ser definida como a degradação bioquímica de contaminantes por microorganismos que podem já estar presentes ou serem adicionados ao local de contaminação, podendo ser ex-situ (realizada fora do foco de contaminação) ou in-situ (realizada no local de contaminação).

O landfarming é um exemplo de biorremediação que envolve a redução das concentrações de constituintes de petróleo por meio de processos de volatilização e biodegradação, envolvendo em geral a propagação de solos contaminados escavados e estímulos para degradação microbiana como aeração, adição de minerais, nutrientes e umidade, sendo muito empregada pelo seu baixo custo e alta taxa de sucesso.

No processo de biorremediação para tratamento de contaminação por borras oleosas a ação de biossurfactantes é de extrema relevância visto a sua capacidade de solubilização dos compostos hidrofóbicos com consequente aumento da taxa de biodegradação por aumentar a biodisponibilidade desses compostos aos microorganismos que desempenharão o processo de degradação, acelerando o processo.

Esse trabalho tem como objetivo isolar os microorganismos presentes em biorreator de batelada alimentada com óleo e meio mínimo, contendo solo de Landfarm de borras oleosas da refinaria de petróleo Landulfo Alves, e avaliar a produção de biossurfactantes por esses microorganismos (tanto individualmente, quanto em consórcio) em testes utilizando óleo contaminante das praias do Nordeste coletado nas praias de Ilhéus/Bahia no ano de 2019.

Metodologia

Nesse estudo, as amostras microbianas são oriundas de um biorreator de batelada alimentada com

meio mínimo e petróleo como única fonte de carbono. Esse biorreator foi condicionado a pressão seletiva durante anos e realizado a partir de amostras de solo de Landfarm de borras oleosas da refinaria petrolífera de Landulfo Alves, (São Francisco do Conde – Bahia). A realização dos experimentos ocorreu no Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LABMI), situado no Centro de Biotecnologia e Genética da Universidade Estadual de Santa Cruz.

As amostras do óleo bruto utilizado como para avaliação da atividade biossurfactante do consórcio e dos isolados provém de coletas realizadas em Olivença (Ilhéus-Bahia) e Serra Grande (Uruçuca-Bahia) no ano de 2019, durante o derramamento de borras oleosas que ocorreu no litoral nordestino.

Isolamento dos microorganismos:

Para o isolamento dos microorganismos capazes de produzir biossurfactantes ao serem submetidos ao óleo bruto contaminante foram preparados dois erlenmeyers de 250mL com 25mL de meio líquido RM, autoclavados a 121°C por 15 minutos. Posteriormente, os respectivos erlenmeyers foram inoculados com 0,5mL de amostra do biorreator e incubados sobre agitação constante a 200rpm a temperatura ambiente em incubadora orbital.

Após a observação da turvação do meio de cultura (24h) foram realizadas diluições seriadas em salina estéril a 0,85%. 100µL das diluições de 10^{-3} e 10^{-7} foram plaqueadas por espalhamento em meio sólido RM em duplicatas e incubadas em estufa bacteriológica por 48h.

As placas referentes a diluições de 10^{-6} e 10^{-7} foram selecionadas para realização de semeaduras por esgotamento, em meio RM sólido até a obtenção de culturas puras.

As alíquotas que não foram submetidas a diluição seriada foram denominadas de consórcio microbiano e foram refrigeradas a 4°C para posterior análise de produção de biossurfactantes.

Avaliação da produção de biossurfactantes por colapso da gota:

Para avaliar o potencial de produção de biossurfactantes de forma individual os isolados foram inoculados em meio líquido RM sem adição de fonte carbono. Após incubação sob agitação constante em temperatura ambiente durante 48 horas uma alíquota de 1mL foi coletada e centrifugada por 5min a 5000rpm. O sobrenadante foi reservado e utilizado para teste de colapso da gota em placa de ELISA de 96 poços onde em cada poço foi acrescentado 18µL de petróleo e 40µL de sobrenadante. Observou-se a ocorrência do colapso da gota imediatamente e após algumas horas.

Para a avaliação do potencial de produção de biossurfactantes pelo consórcio microbiano, essas amostras foram submetidas a centrifugação a 5000rpm por 5min para obtenção do sobrenadante e em seguida foi adicionado 40µL desse sobrenadante em placa de ELISA de 96 poços contendo 10 µL de óleo bruto em cada poço.

Nos dois testes foram utilizados como controle positivo o SDS e como controle negativo água em substituição ao sobrenadante.

Resultados e Discussão

No processo de plaqueamento por espalhamento das amostras diluídas em salina e encubadas em estufa bacteriológica, obteve-se colônias isoladas nas placas a referentes as diluições 10^{-6} e 10^{-7} , que foram plaqueadas em duplicata. Na figura 01, evidencia-se a diversidade microbiana das colônias presentes nessas diluições.



Figura01: Diversidade microbiana evidenciada em amostras de diluição referentes as diluições 10^{-6} e 10^{-7} .

Posteriormente, as colônias foram semeadas por estriamento composto para isolamento em culturas puras e após o crescimento foram selecionadas para análise da produção isolada de biossurfactantes bem como para posteriores estudos. Algumas colônias isoladas podem ser evidenciadas nas Figuras 02 e 03. Dos microorganismos isolados, foi possível identificar 49 morfotipos diferentes entre si de acordo com as características da colônia. Cada um desses isolados morfologicamente distintos foi observado em microscopia pela técnica de coloração de gram, sendo a maioria destes bacilos gram negativos. Com isso, pode-se supor que bacilos gram negativos possuem uma maior resistência de sobrevivência em superfícies oleosas e possuem aspectos enzimáticos importantes na degradação dessa matéria como fonte de carbono.



Figura02 e 03: Colônias isoladas do consórcio microbiano.

Para realização do teste de colapso da gota nas colônias isoladas, foram utilizados o sobrenadante dos microorganismos crescidos em cultura pura, obtidos por meio de centrifugação. Essa avaliação foi de caráter qualitativo. Dos 49 morfotipos isolados, 27 foram testados no presente estudo em isolado. Desses 27 isolados testados, 21 apresentaram características positivas qualitativamente, incluindo: diminuição da tensão superficial entre óleo e água, emulsificação. O consórcio microbiano também foi testado e apresentou um colapso da gota mais evidente e imediato. As figuras 04 e 05 evidenciam o experimento de colapso da gota em placas de ELISA de 96 poços. A figura 05 demonstra que a eficácia da degradação por parte do sobrenadante do consórcio foi superior.

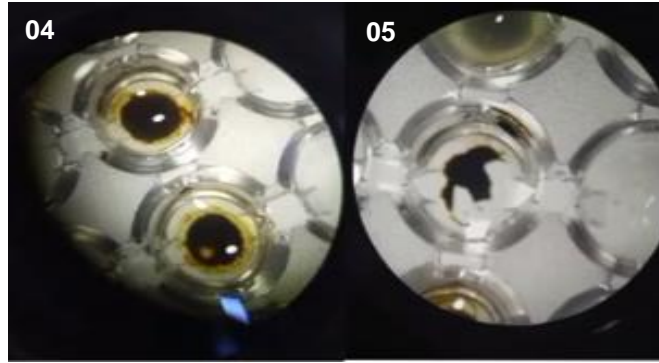


Figura 04 e 05: Experimento de colapso da gota em que 04 representa isolados individualmente e 05 representa o consórcio microbiano.

Conclusões

Com a realização desse trabalho foi possível avaliar a produção de biossurfactantes por microorganismos isolados de biorreator de batelada alimentada para o tratamento de borras oleosas. 21 dos 27 isolados passíveis de serem identificados apresentaram resultados promissores nos testes de colapso da gota. No entanto, o colapso da gota evidenciado pelo consórcio microbiano apresentou-se com imediatez e extrema eficácia demonstrando que a interação entre os microorganismos ali presentes impulsiona a produção de biossurfactantes. Os biossurfactantes em questão foram produzidos sob condições aeróbias e brandas. Novos estudos são necessários para realização de identificação morfológica e molecular dos isolados presentes bem como do seu potencial enzimático e produtos de degradação para avaliar a possível aplicação destes em processos de biorremediação.

Referências bibliográficas

- AGRA, Ariane Costa. **Avaliação da produção de biossurfactantes por microorganismos e consórcio microbiano obtidos de biorreator de batelada alimentada para fins de biorremediação**. Dissertação (Mestrado em Biologia e Biotecnologia de Microorganismos) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus, p.59, 2021.
- ANDRADE, Juliano de Almeida; AUGUSTO, Fabio; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética química**, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2010.
- BAPTISTA, Sandro José. **Avaliação do emprego de biossurfactante na biorremediação de solos contaminados com óleo diesel**. 2007. Tese de Doutorado. Tese de D. Sc., EQ/UFRJ. Rio de Janeiro, RJ, 141p.
- MACIEL, B. M. et al. Simple DNA extraction protocol for a 16S rDNA study of bacterial diversity in tropical landfarm soil used for bioremediation of oil waste. **Genet Mol Res**, v. 8, n. 1, p. 375-388, 2009.
- MARIANO, Jacqueline Barboza. Impactos ambientais do refino de petróleo. **Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 2001.
- SCHUCHARDT, Ulf; RIBEIRO, Marcelo L.; GONÇALVES, Adilson R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima?. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 247-251, 2001.
- SILVA, Gislaine S. et al. Biodegradability of soy biodiesel in microcosm experiments using soil from the Atlantic Rain Forest. **Applied soil ecology**, v. 55, p. 27-35, 2012.
- TONINI, Rita Maria Costa Wetler; DE REZENDE, Carlos Eduardo; GRATIVOL, Adriana Daudt. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **CEP**, v. 28013, p. 602, 2010.