

## VI-187 – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DEGRADADOR DE BACTÉRIA ISOLADA DE ÁREA CONTAMINADA POR HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

**Débora Fernanda Guimarães**<sup>(1)</sup>

Acadêmica de Engenharia Sanitária e Ambiental pela Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

**Karen Mamoré de Matos**<sup>(1)</sup>

Acadêmico de Engenharia Sanitária e Ambiental pela Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

**João Momonuki**<sup>(1)</sup>

Acadêmica de Engenharia Sanitária e Ambiental pela Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

**Raulmar Rodrigues de Freitas Filho**<sup>(1)</sup>

Acadêmico de Engenharia Sanitária e Ambiental pela Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

**Eduardo Beraldo de Moraes**<sup>(1)</sup>

Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP). Professor Adjunto IV na Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) ministrando disciplinas no curso de Engenharia Sanitária e Ambiental. Docente do Programa de Mestrado em Recursos Hídricos da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

**Endereço**<sup>(1)</sup>: Universidade Federal de Mato Grosso, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Av. Fernando Corrêa da Costa, 2367– Boa Esperança – Cuiabá – MT – CEP:78060-900 – Brasil – Tel: (65) 3615-8722 – e-mail: [beraldo\\_morais@yahoo.com.br](mailto:beraldo_morais@yahoo.com.br)

### RESUMO

A contaminação de solos e águas por hidrocarbonetos derivados do petróleo é uma grande preocupação atual devido às características tóxicas, mutagênicas ou carcinogênicas desses compostos. Uma vez detectada a contaminação, é necessário que processos de remediação sejam aplicados como forma de proteção ambiental e saúde humana. Dentre as técnicas de remediação, a biorremediação se destaca pelo baixo custo quando comparada às demais técnicas físico/químicas e também pelo apelo ambiental, já que usa o metabolismo microbiano para degradar os poluentes no ambiente. Assim, este trabalho isolou e avaliou as características morfológicas e bioquímicas de uma linhagem bacteriana a partir de água subterrânea contaminada por hidrocarbonetos. Tal linhagem foi identificada como *Bacillus* sp. e se mostrou capaz de biodegradar diversas frações de alcanos presentes no diesel assim como também produziu biossurfactantes. Tais características apontam essa linhagem como potencial agente biológico a ser aplicado em programas de biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos de petróleo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biorremediação, Diesel, Água Subterrânea

### INTRODUÇÃO

A contaminação de solos e águas subterrâneas por derivados de petróleo representa um grave problema ambiental que vem crescendo nas últimas décadas. Tal contaminação ocorre principalmente durante a exploração, refino, estocagem, transporte e comercialização desse recurso energético (HASSANSHAHIAN et al. 2013). No ambiente urbano, a principal atividade antrópica responsável pelas contaminações por hidrocarbonetos de petróleo é a comercialização dos mesmos em postos de combustíveis.

O petróleo é uma mistura complexa que contém vários compostos, sendo que os hidrocarbonetos (alifáticos ou aromáticos) representam a fração majoritária. Em menores quantidades também estão presentes os compostos não hidrocarbônicos e outros componentes orgânicos e alguns constituintes organometálicos, como complexos de vanádio e níquel. (TONINI et al. 2010). Dentre as diversas frações do petróleo, a aromática, representada pelos compostos monoaromáticos como BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) e PHA (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) são contaminantes ambientais que são tóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos (COSTA, 2001). Assim, ambientes contaminados por essas substâncias devem ser submetidos ao processo de remediação.

Dentre as técnicas utilizadas para remediar ambientes contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, merece destaque, devido ao baixo custo e por ser considerada ecologicamente correta, a biorremediação. Esta utiliza microrganismos ou suas enzimas para degradar os poluentes presentes no ambiente (MORAIS et al. 2014). Os principais microrganismos responsáveis por esse processo são as bactérias e fungos, tanto as leveduras quanto os fungos filamentosos. Diversos são os gêneros microbianos citados na literatura que demonstraram capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos podendo ser citados os gêneros bacterianos *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Halomonas*, *Marinobacter*, *Microbacterium* e *Corynebacterium* (GUO et al. 2010; HASSANSHAHIAN et al. 2012; HASSANSHAHIAN et al. 2014; ROY et al. 2014) e os gêneros fúngicos *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eupenicillium*, *Paecilomyces*, *Bjerkandera*, *Irpex*, *Lentinus* e *Mucor* (VALENTÍN et al. 2006; MARCHUT-MIKOLAJCZYK et al. 2015; AMEEN et al. 2016).

Dentro desse contexto, a busca por linhagens microbianas degradadoras de hidrocarbonetos para uma possível aplicação em processos de biorremediação se faz necessária. Assim, este estudo teve como objetivo caracterizar morfológica e bioquimicamente uma linhagem bacteriana isolada de água subterrânea contaminada por hidrocarbonetos de petróleo e avaliar o seu potencial em degradar tais compostos, assim como a habilidade de produzir biossurfactantes.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ÁGUA SUBTERRÂNEA CONTAMINADA

A linhagem bacteriana foi isolada de água subterrânea contaminada por hidrocarbonetos de petróleo. A contaminação foi originada por um posto de combustível localizado na cidade de Alta Floresta – Estado de Mato Grosso. Este município situa-se no norte do Estado entre as coordenadas 55° 50' a 57° 00' O e 9° 30' a 10° 40' S, localidade que predomina o bioma Amazônico. O posto de combustível está localizado na região central de Alta Floresta e de acordo com a Secretária de Estado do Meio Ambiente (SEMA) de Mato Grosso há um histórico de contaminação de combustível desde 2006.

### ISOLAMENTO DA LINHAGEM BACTERIANA

O meio de cultura Bushnell Haas (BH) foi utilizado para se efetuar o enriquecimento de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos a partir de amostras da água subterrânea. Esse meio consistia de (g/L): 0.2 MgSO<sub>4</sub>, 0.02 CaCl<sub>2</sub>, 1.0 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.0 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.05 FeCl<sub>3</sub> e pH 7.0 e foi suplementado com 1% (v/v) de diesel como única fonte de carbono. Alíquota de 3 mL de água subterrânea foi adicionada em frascos Erlenmeyers contendo 100 mL de meio BH e os frascos foram incubados por 7 dias a 30 °C e 150 rpm de agitação. Após esse período, 3 mL do meio foram inoculados em um novo meio BH e incubados nas mesmas condições. Após uma série de seis repetições desse processo, 1 mL do meio BH foi diluído em solução salina (0.85% m/v) estéril e posteriormente plaqueado em meio de cultura Agar Nutriente. Após o crescimento das bactérias, aquelas que apresentaram características fenotípicas diferentes foram isoladas pela técnica do esgotamento por estria.

A partir dos isolados, foram efetuados testes para a confirmação da capacidade das linhagens bacterianas em degradar hidrocarbonetos de petróleo. Esses testes foram feitos por meio da análise do crescimento bacteriano em meio de cultura BH contendo diesel como única fonte de carbono. O crescimento foi avaliado medindo-se a absorbância do meio no comprimento de onda 600 nm por um período de 96 h. A linhagem que demonstrou maior crescimento foi selecionada e a caracterização morfológica e bioquímica da mesma foi efetuada de acordo com o Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Holt et al., 1998). A Tabela 1 apresenta as características avaliadas.

**Tabela 1: Características morfológicas e bioquímicas da linhagem degradadora de hidrocarbonetos.**

<b>Característica</b>	<b>Técnica/Meio de cultura</b>
Morfologia celular	Avaliação microscópica
Gram	Coloração diferencial (gram)
Endósporo	Coloração a quente com verde malaquita
Motilidade	Picada em meio semi-sólido
Catalase	Decomposição do peróxido de hidrogênio
Oxidase	Fitas para teste
Teste do citrato	Agar citrato de Simmons
Hidrólise da gelatina	Caldo nutriente suplementado com 12% de gelatina
Hidrólise do amido	Caldo nutriente suplementado com 1% de amido
Hidrólise de caseína	Caldo nutriente acrescido de caseína
Teste do vermelho de metila	Caldo MR-VP
Teste Voges-Proskauer	Caldo MR-VP
Produção H <sub>2</sub> S	Agar tríplice açúcar ferro
Fermentação glicose, sacarose e lactose	Agar tríplice açúcar ferro
Urease	Agar ureia

A identificação da linhagem selecionada se baseou no sequenciamento do gene 16S RNA (rRNA). Após as células da linhagem bacteriana crescerem em meio Caldo Nutriente por 18 h, o seu DNA genômico foi extraído utilizando o Kit Bacterial Genomic Miniprep da Sigma Aldrich. O fragmento do gene 16S rRNA foi então amplificado usando os primers 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Os produtos da PCR foi purificado usando o Kit GFX™ PCR Purification (GE Healthcare) e sequenciados pela empresa Genone (Rio de Janeiro, Brasil). A sequência do fragmento do 16S rRNA foi então comparada com as sequências depositadas no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) Database usando a ferramenta BlastN.

### **PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES PELA BACTÉRIA ISOLADA**

Para verificar a produção de biossurfactante pela linhagem bacteriana, esta foi crescida em meio Caldo Nutriente a 35 °C e agitação de 150 rpm, durante 24h. Após, as células em suspensão no meio foram removidas por centrifugação e o sobrenadante utilizado para se efetuar o Teste de Emulsificação. Neste teste, porções iguais do sobrenadante e de algum hidrocarboneto (diesel, querosene, tolueno ou xileno) foram adicionadas em um tubo de ensaio e agitados em vórtex por 2 minutos. A formação de um emulsificado indica a presença de biossurfactantes. O Índice de Emulsificação (IE) foi calculado dividindo a altura da camada emulsificada (CE) pela altura total (AT) e multiplicado por 100 ( $IE (\%) = (CE/AT) \cdot 100$ ) (Pruthi e Cameotra, 1997).

### **DEGRADAÇÃO DE DIESEL PELA BACTÉRIA ISOLADA**

A degradação das diversas frações de alcanos presentes no diesel pela bactéria também foi avaliada. Essa degradação foi feita em meio BH contendo o diesel como única fonte de carbono acrescido da bactéria. A incubação foi feita a 35 °C, em agitação de 150 rpm por 10 dias. Os alcanos foram determinados por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massa (GC-MS). Essa determinação foi feita pela empresa Mérieux Nutriciences (Piracicaba, SP, Brasil).

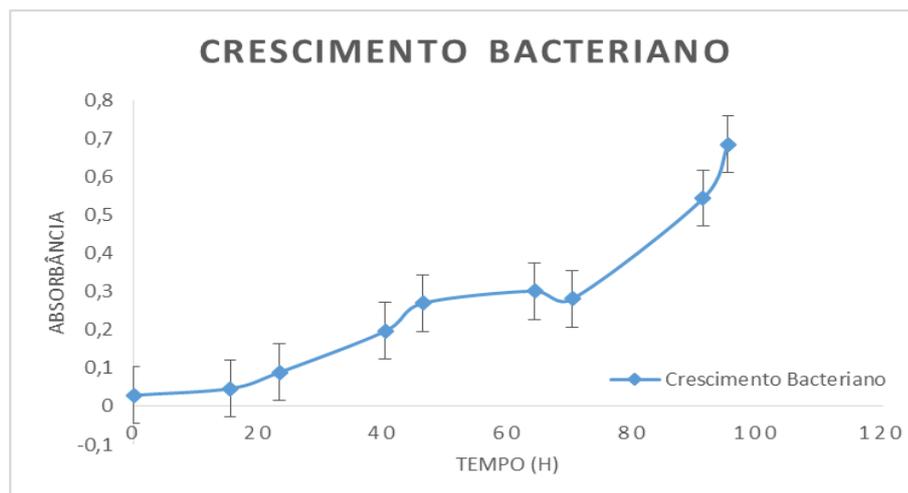
## RESULTADO E DISCUSSÕES

A bactéria estudada é um bacilo Gram positivo e sua colônia é de coloração branca, com bordas irregulares e consistência cremosa. Apresenta esporos e motilidade negativa. As demais características bioquímicas dessa linhagem são apresentadas na Tabela 2. A avaliação da sequência do gene 16S rRNA permitiu identificar a linhagem como *Bacillus* sp.

**Tabela 2: Resultado das características morfológicas e bioquímicas da linhagem bacteriana.**

Parâmetro Avaliado	Resultado	Parâmetro Avaliado	Resultado
Morfologia Celular	Bastonete	Hidrólise do amido	Positivo
Gram	Positivo	Hidrólise da caseína	Negativo
Endósporos	Positivo	Teste do vermelho de metila (MR)	Negativo
Motilidade	Negativo	Voges-Proskauer (VP)	Negativo
Catalase	Positivo	Uréia	Negativo
Oxidase	Negativo	Fermentação glicose	Positivo
Teste de Citrato	Negativo	Fermentação Lactose/Sacarose	Positivo
Hidrólise da gelatina	Positivo	Produção de H <sub>2</sub> S	Negativo

A Figura 1 apresenta a avaliação do crescimento bacteriano no meio de cultura BH contendo diesel como única fonte de carbono. Observa-se o crescimento bacteriano por meio do aumento da absorbância ao longo do tempo indicando que o diesel é metabolizado pela bactéria dando suporte para seu crescimento.



**Figura 1: Crescimento da linhagem bacteriana em meio de cultura BH contendo diesel como única fonte de carbono.**

Compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras. Dentre algumas funções apontadas para os biossurfactantes, está a emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, facilitando o crescimento do microrganismo nestes substratos (Nitschke e Pastore, 2002). Neste estudo a produção de biossurfactantes pela linhagem bacteriana foi avaliada por meio do índice de emulsificação (IE). Os IE das diversas fontes de hidrocarbonetos são apresentados na Tabela 3 (medido 5 minutos após a agitação em vórtex) e Tabela 4 (medido 24 h após a agitação em vórtex). Com a emulsificação das fontes de hidrocarbonetos, com exceção do diesel, conclui-se que a linhagem bacteriana estudada possui a capacidade de

produzir biossurfactantes. A medida do IE após 24 h é importante para avaliar a estabilidade do biossurfactante produzido. Houve pequena redução do IE para as fontes tolueno e xileno, enquanto que o IE da fonte querosene não se alterou. Isso mostra que o biossurfactante produzido possui certa estabilidade.

**Tabela 3: Cálculo do IE medido 5 minutos após a agitação em vórtex.**

	Altura Total (cm)	Camada Emulsificada (cm)	IE
Diesel	3,90	0,00	0%
Querosene	4,20	2,40	52%
Tolueno	3,70	2,00	56%
Xileno	3,60	0,40	11%

**Tabela 4: Cálculo do IE medido 24 h após a agitação em vórtex.**

	Altura Total (cm)	Camada Emulsificada (cm)	IE
Diesel	3,90	0,00	0%
Querosene	4,25	2,20	52%
Tolueno	3,80	1,10	29%
Xileno	3,90	0,30	8%

A partir dos resultados da análise de GC-MS foi possível avaliar a degradação das frações de alcanos pelo *Bacillus* sp. (Tabela 5). Verificou-se que todas as frações (C12 a C27) foram degradadas, porém não completamente. Setti et al. (1995) relataram que a taxa de degradação das diversas frações dos n-alcanos é inversamente proporcional ao comprimento da cadeia carbônica. Entretanto, neste estudo não foi verificado esse padrão sendo que a fração que mais foi degradada foi a C21 (92%) indicando que a biodegradação dos n-alcanos também está relacionada com as características da bactéria e não somente ao comprimento da cadeia carbônica.

**Tabela 5: Taxa de degradação de alcanos presentes no diesel pela linhagem bacteriana (*Bacillus* sp.).**

<i>n</i> -alcano	Taxa de degradação (%)
C12	21
C13	28
C14	15
C15	25
C16	62
C17	8
C18	17
C19	30
C20	17
C21	92
C22	10
C23	20
C24	17
C25	8
C26	3
C27	12

## CONCLUSÃO

A linhagem bacteriana isolada de ambiente subsuperficial (água subterrânea) foi identificada como *Bacillus* sp. Essa possui a capacidade de produzir biossurfactantes que poderá ser explorada visando sua produção e aplicação em ambientes contaminados por hidrocarbonetos. Tal linhagem também possui a capacidade de degradar diesel sendo um microrganismo em potencial para ser aplicado em programas de biorremediação de áreas contaminadas por derivados de petróleo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMEEN, A. F.; MOSLEM, M.; HADI, S.; AL-SABRI, A. E. Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.23, p.211–218, 2016.
2. COSTA, A. F. **Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos: determinação de 1-hidroxipireno urinário**. 2001. 80 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2001.
3. GUO, C.; DANGA, Z.; WONG, Y.; TAM, N. F. Biodegradation ability and dioxigenase genes of PAH-degrading Sphingomonas and Mycobacterium strains isolated from mangrove sediments. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, n. 6, p. 419–426, 2010.
4. HASSANSHAHIAN, M.; AHMADINEJAD, M.; TEBYANIAN, H.; KARIMINIK, A. Isolation and characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoir waste water in Iran (Kerman and Tehran provenances). **Marine pollution bulletin**, v. 73, n. 1, p. 300–5, 2013.
5. HASSANSHAHIAN, M.; EMTIAZI, G.; CAPPELLO, S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. **Marine pollution bulletin**, v. 64, n. 1, p. 7–12, 2012.
6. HASSANSHAHIAN, M.; ZEYNALIPOUR, M. S.; MUSA, F. H.. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance). **Marine pollution bulletin**, v. 82, n. 1–2, p. 39–44, 2014.
7. HOLT, S.G., KRIEY, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative for Bacteriology**. New York: Williams and Wilkins, 1998.
8. MARCHUT-MIKOLAJCZYK, O.; KWAPISZ, E.; WIECZOREK, D.; ANTCZAK, T. Biodegradation of diesel oil hydrocarbons enhanced with *Mucor circinelloides* enzyme preparation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.104, p.142-148, 2015.
9. MORAIS, E. B., TAUK-TORNISIELO, S. M.; KATAOKA, A. P. A. G. Bioremediation of contaminated soil by sludge oil using the biopiles ameliorated. **Holos Environment**, v.14, n.1, p.38-48, 2014.
10. NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.
11. PRUTHI V., CAMEOTRA S.S. Rapid identification of biosurfactant- producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. **Biotechnology Techniques**, v.11, p.671–674, 1997.
12. ROY, A. S.; BARUAH, R.; BORAH, M.; SINGH, A. K.; BORUAH, H. P. D.; SAIKIA, N.; DEKA, M.; DUTTA, N.; BORA, T. C. Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 94, p. 79–89, 2014.
13. SETTI, L.; PIFFERI, P. G.; LANZARINI, G. Surface tension as a limiting factor for aerobic n-alkane biodegradation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 64, p.41–48, 1995.
14. VALENTÍN, L.; FEIJOO, G.; MOREIRA, M. T.; LEMA, J. M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest and salt marsh soils by white-rot fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.58, p.15–21, 2006.
15. WETLER-TONINI, R. M. C.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 4, p. 1010-1020, 2010.