

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BIOLOGIA

EFEITO DA PRESENÇA DE CARBOIDRATO E PETRÓLEO NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE E BIOMASSA POR BACTÉRIAS AMBIENTAIS

¹ Patricia Perez Oliveira (IC-FAPERJ); ¹ Natascha Krepsky Vinagre (Orientadora)

1 - Departamento de Ciências do Ambiente; Instituto de Biociências; Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Apoio Financeiro: FAPERJ

Palavras-chave: taxa de emulsão, hidrocarbonetos, biorremediação.

INTRODUÇÃO

Acreditando-se em seu alto potencial de depuração, o ambiente marinho vem sofrendo com a intensificação das atividades petroleiras. Os principais xenobiontes oriundos destas ações são os hidrocarbonetos de petróleo. Quando há contaminação, ocorrem danos ambientais severos, com mortandade de animais, impedimento de trocas gasosas na interface água/ar, entre outros (CARNEIRO & GARIGLIO, 2010).

Neste cenário, estratégias ambiental e economicamente viáveis para descontaminação de ambientes impactados por hidrocarboneto devem ser estudadas e cientificamente dominadas. A biorremediação, então, deve ser considerada como uma técnica passível de futuras aplicações in situ, com menores custos ecológicos quando comparadas a outros métodos físico-químicos (CANTAGALLO et al., 2007).

Considerando que compostos oleosos encontram-se indisponíveis à biodegradação, a produção de um metabólito que emulsifique a camada oleosa deve ser intensificada. O biossurfactante, como agente emulsificante, aumenta a superfície de contato à ação microbiota, intensificando a biodegradação do hidrocarboneto. Além da biodisponibilidade do xenobionte, outras variáveis devem ser consideradas para otimização do processo, como a presença de microrganismos com capacidade de degradação e condições ambientais favoráveis às atividades metabólicas da biota local (SATPUTE et al., 2010).

A relevância deste trabalho está na necessidade da intensificação de estudos que tangenciem a biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. Esta técnica torna-se viável, considerando seu menor impacto ambiental, comparada às demais formas de remediação físico-químicas (CANTAGALLO et al., 2007). Além disso, a intensificação da exploração deste recurso energético pode acarretar em possíveis derramamentos de óleo, sendo fundamental o pleno domínio de técnicas para descontaminação menos agressivas e impactantes.

OBJETIVO

Verificar a influência de carboidratos e petróleo na produção de biossurfactante e biomassa.

METODOLOGIA

3.1. Área de estudo

O local onde as amostras foram coletadas situa-se no manguezal de Magé, RJ (Figura 1), sede do Projeto Manguê-Vivo, da Fundação Onda Azul. Este ambiente está localizado no entorno da Baía de Guanabara, alvo de intensa agressão ambiental, com uma refinaria de petróleo situada em sua proximidade.

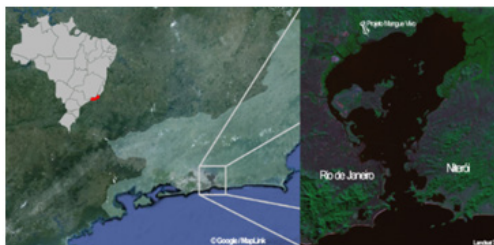


Figura 1: Imagem de Landsat da área de amostragem.

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

3.2. Amostragem

Foram coletadas 20 g de sedimento do manguezal de Magé, RJ, sendo inoculados 10 g em 100 mL de meio nutriente salgado (MNS) e 10 g em MNS com adição de 0,5 mL de petróleo API 28°. A incubação foi realizada em laboratório, a 37°C. Após 14 dias de incubação, as amostras foram crioconservadas, segundo SOLA et al. (2012). As análises posteriores (taxa de emulsificação da gasolina e leitura da densidade ótica) foram feitas a partir do repique de 0,1 mL de cada amostra crioconservada em 130 mL de meio de cultura.

3.3. Produção de Biossurfactante e Biomassa

A produção de biossurfactante foi mensurada pela quantificação da taxa de emulsão da gasolina (TE) (PARASZKIEWICZ et al., 2002). Foram adicionados 4 mL de meio de cultura com crescimento bacteriano e 6 mL de Gasolina Comum em um tubo de ensaio, com rolha. O sistema foi agitado em vórtex, por 1 min e deixado em repouso por 24h. A partir da relação entre a altura da emulsão na camada oleosa e da altura da camada oleosa os resultados foram obtidos, segundo a fórmula:

$$TE = ((\text{Altura da emulsão na camada oleosa})/(\text{Altura da camada oleosa}) * 100) - TE_{\text{Branco}}$$

A produção de biomassa foi realizada por meio da leitura de densidade ótica (DO), em espectrofotômetro, a 470 nm.

As análises de TE e DO foram realizadas em triplicata, com leituras diárias, por um intervalo de 10 dias, para cada uma das condições de crescimento testadas.

3.4. Condições de crescimento

Foram utilizados os carboidratos maltose e sacarose, como fontes de carbono, em uma concentração de 3,3 g/L de carbono. Para cada condição, foram realizadas duas réplicas. A uma delas foi adicionada 1 mL de petróleo API 28°. Além disso, foi utilizado o meio MNS, sem fontes adicionais de açúcar, com uma das réplicas com petróleo.

RESULTADOS

A Figura 2 mostra a variação no aumento da taxa de emulsão da gasolina e da densidade ótica das amostras ao longo do tempo. Os resultados mostram que as réplicas incubadas na ausência de fontes de carboidrato apresentaram maior produção de biossurfactante e biomassa, mesmo na ausência do hidrocarboneto, com a TE variando de 80 % a 100 % após o terceiro dia de incubação. Para MNS+maltose, houve decaimento da TE após o segundo dia, variando entre 98 % e 13 %, 83 % e 15 %, para as réplicas sem e com petróleo, respectivamente. A partir do terceiro dia, a TE em MNS+sacarose reduziu de 72 % para 4,5 %, e de 68 % para 14 %, nas réplicas sem e com petróleo, respectivamente. Com relação ao crescimento bacteriano, as amostras sem carboidrato permaneceram maior tempo na fase exponencial (até o oitavo dia), com as absorvâncias da fase estacionária variando entre 0,874 e 0,915 (sem PET) e 0,903 e 0,953 (com PET). As réplicas com maltose apresentaram a fase estacionária a partir do quinto dia, com variação das absorvâncias entre 0,548 e 0,573 (sem PET) e 0,523 e 0,577 (com PET). No meio com sacarose, houve uma produção de biomassa menos acelerada, com a fase estacionária a partir do terceiro dia, tendo as absorvâncias variando entre 0,248 e 0,338 (sem PET) e 0,504 e 0,422 (com PET).

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

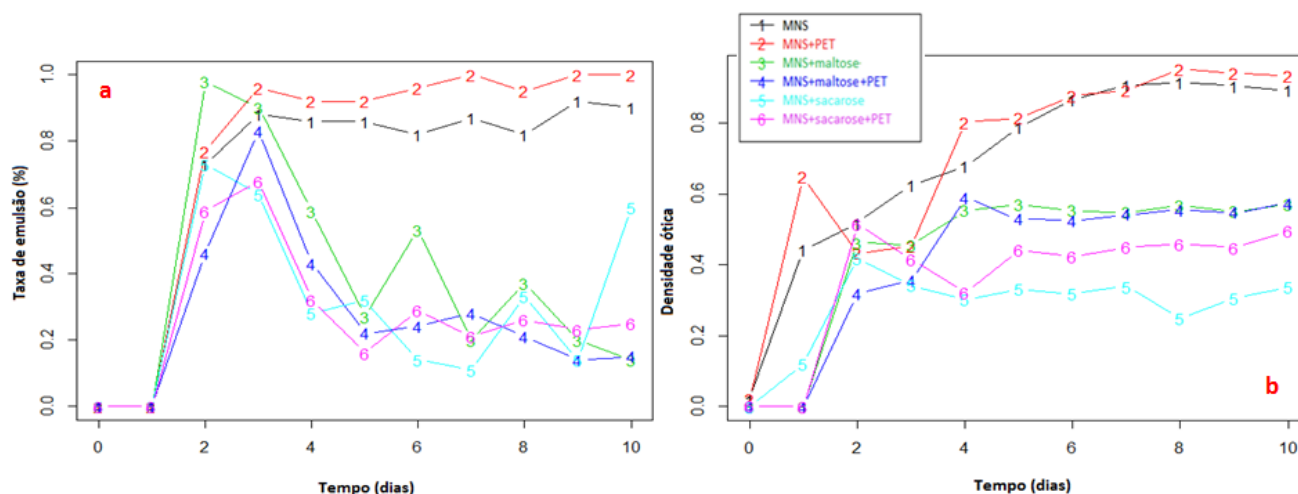


Figura 2: Variação da taxa de emulsão da gasolina (a) e da densidade ótica (b) sob as diferentes condições de meio de cultura, ao longo de 10 dias.

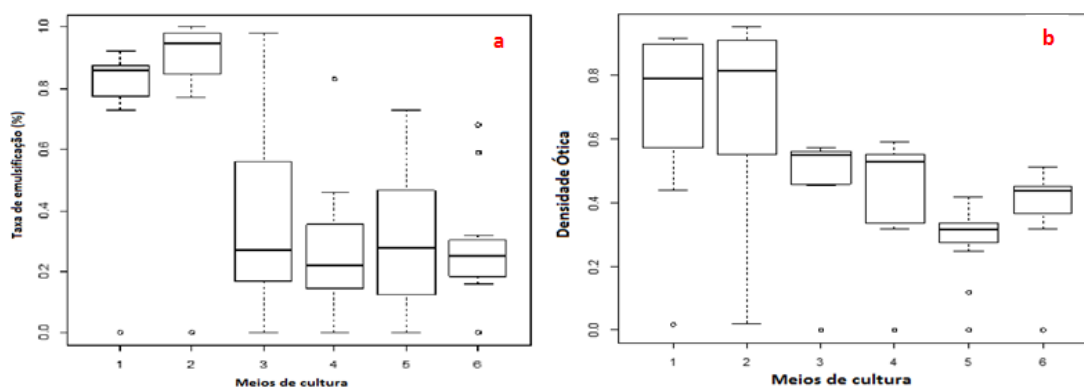


Figura 3: Comparação entre as medianas e quartis para: taxa de emulsificação da gasolina (a) e densidade ótica (b) nos meios de cultura testados. Em y, taxa de emulsão (%). Em x, meio de cultura: 1 – meio nutriente salgado (MNS); 2 – MNS + PET; 3 – MNS+maltose; 4 – MNS+maltose + PET; 5 – MNS+sacarose; 6 – MNS+sacarose + PET.

A Figura 3 possibilita comparar as medianas dos valores obtidos para TE (a) e DO (b), nos diferentes meios de cultura testados (MNS; MNS+PET; MNS+maltose; MNS+maltose+PET; MNS+sacarose; MNS+sacarose+PET). Os resultados mostram que o meio MNS com petróleo apresentou maior produção de biossurfactante e biomassa, com 50% das leituras de cada réplica com seus valores inseridos entre, aproximadamente, 100% e 80% para taxa de emulsão (TE), e 0,9 e 0,5 para densidade ótica. A segunda melhor condição de crescimento foi observada no meio MNS, sem petróleo, com 50% das leituras com valores para TE variando entre 70% e 90%. Para a densidade ótica, a variação esteve contida entre 0,5 e 1,0. Os demais meios de cultura tiveram resultados variando entre 60% e 10% para taxa de emulsão e, de 0,6 e 0,2 para densidade ótica.

Para verificar a influência do petróleo e carboidrato na TE e no crescimento bacteriano, o teste estatístico de Wilcoxon foi realizado. Este sugeriu que houve diferença na te, com relação à presença de petróleo, apenas nas réplicas sem carboidrato e com maltose ($p < 0,05$). nas réplicas com sacarose não foi significativo. porém, para o crescimento bacteriano, as únicas réplicas que apresentaram diferença significativa foi as contendo sacarose (com/sem petróleo). nas demais o hidrocarboneto não interferiu no crescimento bacteriano. com relação à presença/ausência de carboidrato, em todas as réplicas os resultados foram significativos, tanto para te quanto para do. com o teste estatístico (que mostrou a diferença entre as réplicas com carboidrato e sem carboidrato) é possível afirmar que a presença de carboidrato inibiu tanto a te quanto a do, pela visualização das figuras (todos os resultados foram inferiores às réplicas sem carboidrato).

A presença de carboidrato diminuiu a produção de biossurfactante, necessário para a biodegradação do hidrocarboneto (CHRZANOWSKI et al., 2012 & SATPUTE et al., 2010). O carboidrato pode ser indicado como preferência em processos de oxidação, principalmente a maltose, sendo um açúcar redutor. O petróleo, por outro lado, possui maior resistência à biodegradação microbiológica devido à presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em sua constituição (SILVA, 2011).

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Além disso, a presença do petróleo, como única fonte de carbono, inferiu uma maior produção de biomassa, possibilitando ao consórcio permanecer por um maior período de tempo em crescimento exponencial. De acordo com COMEOTRA e MAKKAR (1998), os biossurfactantes são liberados no meio, em maior quantidade, nas fases exponencial e estacionária, com maior densidade celular. Este metabólito é fundamental para o meio ambiente, impactado por compostos hidrofóbicos, pois aumenta a área superficial das gotículas de óleo, possibilitando o acesso de um maior número de bactérias que, consequentemente, produzem mais biomassa (WETLER-TONINI et al., 2010).

CONCLUSÃO

A presença de petróleo intensificou a produção de biossurfactante nas réplicas sem carboidrato e com maltose ($p < 0,05$). O mesmo não ocorreu nas réplicas com sacarose, possivelmente devido à dificuldade de oxidação deste carboidrato (não redutor). A presença de açúcares diminuiu a produção de biossurfactante e biomassa, indicando uma preferência na utilização de carboidrato como fonte de carbono, havendo menor estímulo da produção do metabólito de interesse. A próxima etapa do projeto será aumentar a concentração de carboidratos, visando testar a influência destes na produção de biossurfactante e biomassa.

REFERÊNCIAS

- CANTAGALLO, C.; MILANELLI, J. C. C.; DIAS-BRITO, D. Limpeza de ambientes costeiros brasileiros contaminados por petróleo: uma revisão. *Pan-American Journal of Aquatic Science*, 2(1), p. 1-12, 2007.
- CARNEIRO, D. de A.; GARIGLIO, L. P. A biorremediação como ferramenta para a descontaminação de ambientes terrestres e aquáticos. *Revista Tecer – Belo Horizonte*, vol. 3, nº 4, mai. 2010.
- PAKASZKIEWICZ, K., KANWAL, A., DLUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *J. Biotech.* v. 92, p. 287- 294, 2002.
- SATPUTE, S. K.; BANAT, I. M.; DHAKPHALKAR, P. K.; BANPURKAR, A. G.; CHOPADE, B. A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnology advances*, v. 28, n. 4, p. 436-50, 2010.
- SOLA, M. C.; OLIVEIRA, A. P. de; FEISTEL, J. C.; REZENDE, C. S. M.. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia*, v. 8, n. 14, p. 1398, 2012.
- CHRZANOWSKI, L.; LAWNICZAK, L.; CZACZYK, K.. Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Holanda, v. 28, p. 401-419, 2012.
- SILVA, A.M.F.D. da. 44 p. 2011. Biodegradação de petróleo e produção de biossurfactante por bactérias nativas do sedimento de manguezal de Garçaú, São Francisco do Itabapoana – RJ. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Centro de Biociências e Biotecnologia. Universidade Estadual do Norte Fluminense, RJ. 2011.
- COMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S.. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50:520-529, 1998.
- WETLER-TONINI, R.M.; REZENDE, C.E. DE; GRAVITOL, A.D.. Degradação e biorremediação de compostos de petróleo por bactérias: Revisão. *Oecologia Australis*, v. 14, n. 4, p. 1010-1020, 2010.