

Obtenção de consórcio de microrganismos a partir de amostra de petróleo

COSTA, Andréa Fernanda de Santana¹; SILVA, José Roberto Rocha da¹; SANTOS, Roberto César Mendes Marques dos¹; FARIAS, Charles Barbosa B.²; SARRUBO, Leonie Asfora³, JORDÃO, Roziana Cunha Cavalcanti^{3,4}; SALGUEIRO, Alexandra Amorim³

¹Mestrando em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Centro de Ciências e Tecnologia (CCT), Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP);

²Graduando em Engenharia Ambiental, CCT, UNICAP;

³Professora-Pesquisadora, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), CCT, UNICAP; aas@unicap.br;

⁴Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco.

Resumo

A biodegradação e a biorremediação de petróleo e seus efluentes industriais podem ser realizadas por populações naturais de microrganismos. Os consórcios microbianos podem ser utilizados como inóculos em tratamentos biológicos, visando a reduzir o tempo de degradação de resíduos. São constituídos por uma complexa população de espécies que, em sinergismo, são potencialmente aplicados na biodegradação de poluentes derivados do petróleo. O objetivo deste trabalho foi obter consórcios de microrganismos a partir de amostra de petróleo e investigar o potencial biotecnológico para aplicação na biodegradação de contaminantes ambientais oriundos da indústria petrolífera. Dois reatores com volume útil de 1,5 L foram inoculados com amostra de petróleo e água na proporção de 1:1, a 30°C, 1 vvm e 250 rpm, sendo adicionados nutrientes a um dos reatores. O crescimento microbiano foi avaliado por contagem padrão de bactérias e contagens de fungos filamentosos e leveduras. O potencial biotecnológico dos consórcios foi avaliado por atividades oxidases e produção de biosurfactantes. Nos dois consórcios investigados (enriquecidos ou não), ficou evidenciado, até o nono dia de cultivo, o crescimento exponencial de microrganismos, atingindo 10^5 UFC.mL⁻¹ para bactérias, 10^2 UFC.mL⁻¹ para fungos filamentosos e 10^3 UFC.mL⁻¹ para leveduras. Nas amostras dos consórcios investigados, foram detectadas atividades oxidases na presença de ácido tânico e ácido gálico. Foi observada atividade de emulsificação com a mistura petróleo-água durante a obtenção dos consórcios microbianos. A presença de bactérias e fungos nas amostras de petróleo que, sob condições adequadas, desenvolvem-se com formação de consórcios de microrganismos tem potencial aplicação na biodegradação de poluentes derivados do petróleo.

Palavras-chave: petróleo, biodegradação, consórcio de microrganismos.

Microbial consortia production from petroleum

Abstract

Biodegradation and bioremediation of petroleum and its industrial wastes can be reached by microorganisms. Microbial consortia can be used as inocula in biologic treatments to reduce the period of degradation of the residues. They are constituted by a complex population of synergic species with potential of application in the biodegradation of petroleum derivatives. The aim of this work was to obtain consortia of microorganisms from a petroleum sample and to investigate the biotechnological potential for application in the biodegradation of environmental pollutants from the petroleum industry. Two reactors with 1.5 L capacity were inoculated with a sample of petroleum and water (1:1 v/v) with and without nutrients at 30 °C, 1 vvm and 250 rpm. The microbial growth was determined by cell counts of bacteria, filamentous fungi and yeasts. The biotechnological potential of the consortia was evaluated throughout determination of oxidase activity and biosurfactant production by using emulsification activity analyse. For both consortia investigated (with and without nutrient supplementation) after nine days of cultivation, exponential growths of 10^5 CFU.mL⁻¹ for bacteria, 10^2 CFU.mL⁻¹ for filamentous fungi and 10^3 CFU.mL⁻¹ for yeasts were observed. Oxidase activities were detected for both consortia in the presence of tannic and gallic acids. An emulsification activity was detected. The results show the presence of bacteria and fungi in the petroleum samples that grow under specific conditions thus forming microbial consortia with potential of application in the biodegradation of petroleum pollutant derivatives.

Key-words: petroleum, biodegradation, microbial consortium.

Introdução

Os problemas da poluição ambiental decorrem do aumento populacional do planeta e do processo de industrialização, gerando resíduos que poluem o solo, a atmosfera e a água. Dentre as atividades de industrialização, a exploração, produção, refino, transporte e comercialização do petróleo apresentam risco ambiental por serem produzidos resíduos tóxicos.

A indústria do petróleo é responsável pela geração de grande quantidade de resíduos oleosos e viscosos de significativa recalcitrância, dificultando o reaproveitamento desses poluentes. Na última década, bioprocessos para o tratamento desses efluentes têm sido investigados visando a minimizar ou prevenir os impactos causados ao meio ambiente (URURAHY; PEREIRA JR; MARINS, 1998).

A complexa mistura do petróleo apresenta, dentre os principais componentes, alcanos, aromáticos e naftênicos, que podem ser degradados por microrganismos. Queiroga, Nascimento e Serra (2003) observaram a produção de diferentes tipos de agentes de superfície ativa, sintetizados por uma larga variedade de microrganismos a partir de petróleo. Muitas bactérias são capazes de emulsificar hidrocarbonetos em soluções aquosas, facilitando a biodegradação dessas substâncias (KIRCHMANN; EWNETU, 1998).

O processo de biodegradação dos componentes do petróleo ocorre na interface óleo/água. Os microrganismos biodegradadores aderem à superfície do óleo e exploram esse microambiente, que é rico em compostos orgânicos e nutrientes inorgânicos da água do mar. Aumentam as taxas superfície/volume das gotas de óleo pela redução do tamanho das gotas, tanto pelo processo de aderência à superfície quanto pela excreção de surfactantes (BRAKSTAD; FAKSNESS; MELBYE, 2002).

A degradação do petróleo depende da natureza química e do estado físico dos compostos existentes, além das condições ambientais: temperatura, nutrientes, salinidade, pressão, oxigênio (HAMME; SINGH; WARD, 2003). Em áreas contaminadas com petróleo, foi detectada uma grande população de microrganismos de vários gêneros que, individualmente, metabolizam um limitado número de hidrocarbonetos. Na biodegradação de hidrocarbonetos complexos, é necessária a cooperação sinérgica entre espécies distintas de microrganismos para a completa mineralização dos compostos do petróleo em gás carbônico e água ou gás metano e água (URURAHY; PEREIRA JR; MARINS, 1998).

Os consórcios de microrganismos apresentam atividades enzimáticas relacionadas à degradação de substâncias xenobióticas, usualmente presentes em águas industriais oleosas. Nos processos aeróbicos, o oxigênio é requerido para o processo de biodegradação, envolvendo o catabolismo dos hidrocarbonetos por ação de oxidases (GHAZALI *et al.*, 2004).

O processo de biodegradação pode ser acelerado pela utilização das técnicas de bioestimulação e de bioaugmentação. Na bioestimulação, nutrientes são adicionados e as condições ambientais otimizadas visando ao desenvolvimento de populações nativas de microrganismos. Pela bioaugmentação, são adicionados microrganismos capazes de degradar rapidamente os contaminantes específicos (FENIMAN *et al.*, 2006).

O objetivo deste trabalho foi obter consórcios de microrganismos a partir de amostra de petróleo e investigar o potencial biotecnológico para aplicação na biodegradação de contaminantes ambientais oriundos da indústria petrolífera.

Material e métodos

Obtenção de consórcios

Dois reatores de vidro com circulação de água e volume útil de 1500 mL (figura 1) foram inoculados com amostra de petróleo e água na proporção de 1:1, com adição dos nutrientes 4 g.L⁻¹ de glicose

e 1 g.L⁻¹ de sulfato de amônio (consórcio A) ou sem os nutrientes (consórcio B), a 28 - 30 °C, 1 vvm e 250 rpm, durante 30 dias. Após 7 dias de cultivo, pulsos de petróleo foram realizados semanalmente.



Figura 1 Reatores utilizados na obtenção de consórcios microbianos

Avaliação do crescimento microbiano

O crescimento microbiano foi avaliado por contagens viáveis de colônias de acordo com o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1992):

- contagem padrão de bactérias heterotróficas mesófilas a 35 °C por 48 h;
- contagem de fungos filamentosos e leveduras a 20 °C por 5 a 7 dias.

Teste de atividade de emulsificação

Foi utilizada a metodologia de Cooper e Goldenberg (1987) na investigação da capacidade de emulsificação das amostras de consórcios microbianos.

Atividades oxidases

Nas amostras dos consórcios microbianos, foram investigadas as atividades oxidases na presença do ácido tânico e do ácido gálico a 5 % por técnica de difusão em placas, utilizando extrato de malte 15 g.L⁻¹ e ágar 20 g.L⁻¹ nas temperaturas de 30 e 45 °C durante 7 dias (FLOTT; GILBERTSON, 1991).

Resultados e discussão

Amostras de petróleo “in natura” e água adicionadas em reatores de vidro na presença ou não de nutrientes foram cultivadas na temperatura ambiente (28 °C) sob agitação e aeração. A obtenção dos consórcios microbianos foi confirmada pela avaliação do crescimento dos microrganismos.

A tabela 1 ilustra os comportamentos dos consórcios obtidos a partir de petróleo bruto. Os números máximos de bactérias 10⁶ UFC.mL⁻¹ e de fungos filamentosos 10⁴ UFC.mL⁻¹ foram determinados com 16 dias de cultivo pelo consórcio bioestimulado (A). O número máximo de leveduras 10⁶ UFC.mL⁻¹ foi determinado com 23 dias de cultivo nesse mesmo consórcio (A) cuja presença dos nutrientes glicose e sulfato de amônio estimularam a reprodução desses fungos unicelulares.

O consórcio sem nutrientes (B) apresentou menor produtividade de biomassa. O número máximo de bactérias 10⁶ UFC.mL⁻¹ foi atingido apenas com 30 dias de incubação, enquanto foi determinado 10³

UFC.mL⁻¹ de leveduras com 16 dias de incubação.

Os crescimentos dos microrganismos nos consórcios estão ilustrados na tabela 1. Os números máximos de bactérias 10⁶ UFC.mL⁻¹ e de fungos filamentosos 10⁴ UFC.mL⁻¹ foram determinados com 16 dias de cultivo pelo consórcio bioestimulado (A). O número máximo de leveduras 10⁶ UFC.mL⁻¹ foi determinado com 23 dias de cultivo na presença de nutrientes. O consórcio sem nutrientes (B) apresentou menor produtividade de biomassa, atingindo o número máximo de bactérias 10⁶ UFC.mL⁻¹ com 30 dias de incubação.

Tabela 1 Contagens de microrganismos nos consórcios com e sem nutrientes

Tempo (d)	Bactérias (UFC.mL ⁻¹)		Fungos filamentosos (UFC.mL ⁻¹)		Leveduras (UFC.mL ⁻¹)	
	Consórcio A	Consórcio B	Consórcio A	Consórcio B	Consórcio A	Consórcio B
0	1 x 10	1 x 10	1 x 10	1 x 10	0	0
2	5 x 10 ²	4 x 10 ¹	1 x 10	1 x 10	0	3 x 10
4	2 x 10 ³	1 x 10 ²	1 x 10 ²	1 x 10 ²	0	3 x 10 ²
7	5 x 10 ⁴	2 x 10 ³	5 x 10 ³	1 x 10 ²	1 x 10 ²	1 x 10 ²
9	1 x 10 ⁵	2 x 10 ⁵	5 x 10 ³	1 x 10 ²	1 x 10 ⁴	5 x 10 ²
16	1 x 10 ⁶	2 x 10 ⁵	1 x 10 ⁴	1 x 10 ⁴	1 x 10 ⁵	1 x 10 ³
23	5 x 10 ⁵	1 x 10 ⁵	1 x 10 ²	1 x 10 ²	1 x 10 ⁶	2 x 10 ⁴
30	2 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶	<10	2 x 10 ⁴	1 x 10 ⁶	4 x 10 ²

Legenda: consórcio A = na presença de nutrientes
consórcio B = na ausência de nutrientes

A figura 1 ilustra a curva de crescimento bacteriana para os dois consórcios de microrganismos obtidos a partir de petróleo. Não foi observada a “lag” fase. Na fase logarítmica, a taxa de crescimento foi máxima até o quinto dia de incubação. Considerando a adição de pulsos de petróleo durante todo o experimento, não foi observada a fase estacionária máxima até 30 dias de incubação.

Comparando os dois tipos de consórcios obtidos neste trabalho, a bioestimulação por glicose e sulfato de amônio acelerou a reprodução celular das bactérias observada na cinética de crescimento do consórcio A. Um outro fator positivo desse consórcio microbiano foi o número de leveduras máximo determinado: mil vezes maior do que no consórcio B. Por outro lado, o consórcio B obtido na ausência dos nutrientes, dependendo apenas de agitação e de aeração apresenta maior praticidade para futuras aplicações em derramamentos de petróleo no meio ambiente.

Considerando que a população microbiana existente no petróleo atua em sinergismo na natureza, os microrganismos presentes no petróleo bruto metabolizam os compostos presentes, utilizando-os como fonte de carbono e de energia. Conseqüentemente, os consórcios microbianos obtidos diretamente do petróleo “in natura” são constituídos por espécies microbianas que, em sinergismo, são potencialmente aplicados na biodegradação de poluentes derivados do petróleo (GHAZALI *et al.*, 2004).

Pineda-Flores *et al.* (2004) obtiveram um consórcio de bactérias a partir do petróleo, atingindo 10⁵ a 10⁶ UFC.mL⁻¹ na fase estacionária, após 10 semanas de cultivo. Foi avaliada a biodegradação de asfaltenos por microrganismos presentes no petróleo “in natura” na presença de 100 ppm de sais, temperatura ambiente, pH 7,4 e aeração de 1 L.min⁻¹.

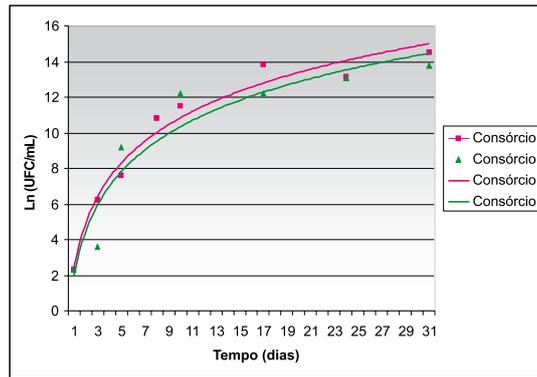


Figura 2 Curvas de crescimento dos consórcios microbianos

Foram detectadas as atividades oxidases na presença de ácido tânico e de ácido gálico a partir do segundo dia de incubação a 30 °C. Halos de coloração característica (marrom) estão ilustrados na figura 3, confirmando a presença de enzimas que oxidaram os dois substratos investigados a 30 °C. Não foi determinada nenhuma atividade oxidase a 45 °C na presença de ácido tânico e de ácido gálico.

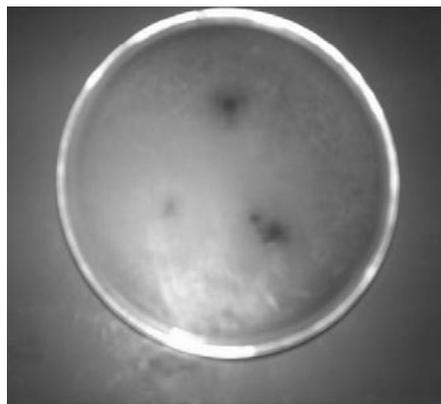


Figura 3 Atividades oxidases de consórcio microbiano

O ácido tânico foi oxidado por todas as amostras dos dois consórcios cujos halos se mantiveram constantes até o quarto dia de incubação. Os melhores resultados foram obtidos por oxidação do ácido gálico por terem os halos de coloração marrom aumentado gradativamente até o sétimo dia de incubação. O maior halo determinado foi de 4 cm, utilizando o consórcio obtido sem nutrientes (tabela 2).

Tabela 2 Halos (cm) de oxidação do ácido gálico pelos consórcios microbianos incubados a 30 °C

Cultivo dos consórcios (d)	Incubação para o teste de oxidases (d)							
	Consórcio A				Consórcio B			
	1	2	4	7	1	2	4	7
2	-	< 0,5	< 0,5	0,5	-	< 0,5	1,0	3,5
7	-	< 0,5	0,6	1,0	-	< 0,5	0,7	1,0
9	-	< 0,5	< 0,5	< 0,5	-	< 0,5	1,0	4,0

Legenda: (-) = teste negativo.

Embora não tenha sido detectada atividade de emulsificação nas amostras dos consórcios, a mistura água-petróleo no reator ficou visualmente separada no início do experimento e, após 2 dias, foi observada uma única fase da mistura todas as vezes que a agitação era desligada. Essa observação comprovou a produção de surfactante com propriedade de emulsificar óleo e água pelo consórcio microbiano obtido, apesar de não ter sido detectada atividade de emulsificação de acordo com a metodologia especificada.

As bactérias, fungos filamentosos e leveduras são agentes transformadores eficazes, face à sua habilidade em degradar ampla gama de substâncias orgânicas, utilizando-as como fontes de carbono e energia durante o crescimento. Devido à complexidade dos processos metabólicos necessários à degradação do petróleo, apenas consórcios de microrganismos com diferentes gêneros e espécies conseguem degradar as frações do óleo (TIBURTIUS; PERALTA-ZAMORA; LEAL, 2004).

Foram biodegradados por consórcios de bactérias e leveduras 100 % de alcanos de cadeias lineares, 85 % de cicloalcanos, 44 % de alcanos ramificados e 31-55 % de aromáticos. Gallego e colaboradores (2007) confirmaram experimentalmente que a biodegradação pelo consórcio de microrganismos obtidos a partir do petróleo ou de solo contaminado com petróleo foi mais eficiente que utilizando os microrganismos isolados.

O tratamento biológico utilizando microrganismos vem sendo apresentado como uma poderosa alternativa biotecnológica, apresentando-se técnica e economicamente viável na recuperação de grandes áreas poluídas. Geralmente, utiliza-se esse tratamento combinado a outros processos para aumentar a remoção de poluentes (KUNZ *et al*, 2002).

Conclusão

Os consórcios de microrganismos formados por bactérias, leveduras e fungos filamentosos com atividades oxidases, obtidos a partir de amostra de petróleo sob cultivo submerso e aerado na presença ou não de nutrientes, apresentam potencial para aplicação na biodegradação de poluentes derivados do petróleo.

Referências

APHA - American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 18. ed., Washington: APHA, 1992. 1268 p.

BRAKSTAD, O. G.; FAKSNESS, L. G.; MELBYE, A. G. Depletion of compounds from thin oil films in seawater. **Proceedings of the twenty-fifth Arctic and marine oil spill program (AMOP)**. Calgary-Canadá. v. 2, 2002.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. **Appl. Environm. Microbiol.** v. 53, p. 224-229, 1987.

FENIMAN, D. P. G.; *et al*. Biodegradação Ambiental: Petróleo e Pesticidas. Disponível em: <http://www.herbario.com.br/bot/toxicologia/biodegre.htm>. Acesso em: 14 set 2006.

FLOTT, J. J.; GILBERTSON, R. L. Cultural studies of four North American species of *Perenniporia* (Aphyllorales: Polyporaceae). **Mycol. Res.** v. 95, p. 1113-1122, 1991.

GALLEGO, J. L. R.; *et al*. Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortium. **Biodegradation**. v. 18, p. 269-281, 2007.

GHAZALI, F. M.; *et al*. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. **Internacional Biodegradation & Biodegradation**. v. 54, p. 61-67, 2004.

- HAMME, J. D. V.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 67, n. 4, p. 503-549, 2003.
- KUNZ, A.; *et al.* Novas tendências no tratamento de efluentes industriais. **Química Nova**. v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.
- KIRCHMANN, H.; EWNETU, W. Biodegradation de desperdícios petróleo-baseados do óleo com composting. **Biodegradation**. v. 9, p. 151-156, 1998.
- PINEDA-FLORES, G., *et al.* A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltene as a carbon and energy source. **Biodegradation**. v. 15, p. 145-151, 2004.
- QUEIROGA, C. L.; NASCIMENTO, L. R.; SERRA, G. E. Evaluation of paraffins biodegradation and biosurfactants production by *Bacillus subtilis* in the presence of crude oil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 34, p. 321-324, 2003.
- TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**. v. 27, n. 3, 2004.
- URURAHY, A. F. P.; PEREIRA JR, N.; MARINS, M. D. M. Desempenho de um biorreator do tipo CSTR no processo de degradação de borra oleosa. **Boletim Técnico da Petrobrás**. v. 41, p. 125-132, 1998.