

# **EFEITO DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Pseudomonas aeruginosa* SOBRE CONSORCIO MICROBIANO DEGRADADOR DE HIDROCARBONETOS**

Fábio Raphael Accorsini,; Maria Benincasa Vidotti. - Ciências Biológicas - Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP- Campus de Jaboticabal

A presença de derivados de petróleo no meio ambiente é de grande interesse ecológico e sanitário, devido ao seu grande tempo de degradação, toxicidade e habilidade de acumularem-se. Entre as tecnologias utilizadas para recuperar os solos contaminados, a biorremediação, processo pelo qual microrganismos transformam os contaminantes em compostos menos tóxicos, tem atraído grande interesse na área ambiental. No entanto, a biodegradação de compostos hidrocarbonados é dificultada devido às sua natureza hidrofóbica e a grande penetração no solo, o que torna estes poluentes indisponíveis à ação microbiana. A utilização de surfactantes vem contornar este problema. O interesse na aplicação de surfactantes obtidos por microrganismos (biosurfactantes) é crescente devido a vantagens que estes compostos possuem com relação aos seus similares quimicamente sintetizados, como por exemplo, sua menor toxicidade ao ambiente e sua biodegradabilidade. Sendo assim, no presente projeto estuda-se os efeitos de um biosurfactante produzido a partir de resíduos da indústria de óleos vegetais, na biorremediação de solos contaminados com derivados de petróleo.

Os hidrocarbonetos de petróleo contêm uma complexa mistura de componentes que podem ser categorizados em quatro frações: saturados, aromáticos, resinas (N, S, O) e asfaltenos (Shell internacional Ltda; 1983), é essa complexa mistura de componentes que dificulta muito a recuperação de áreas contaminadas. Uma grande quantidade de tecnologias está disponível para o tratamento de solo contaminado incluindo escavações, contenção com valas de segurança, extração por vapor, estabilização e solidificação, nivelamento do solo, lavagem do solo, extração por solvente, degradação térmica, vitrificação e incineração (BALBA *et al*, 1998). Muitas dessas tecnologias, porém, possuem um custo muito elevado ou não resultam na completa descontaminação. Por outro lado, o tratamento biológico ou biorremediação vem a ser, entre outros, um método muito promissor na degradação de contaminantes orgânicos, inclusive de derivados de petróleo.

A biorremediação envolve a utilização de microrganismos para degradar os poluentes em um material ou local contaminado. Quando a biodegradação de compostos orgânicos ocorre até sua conversão a compostos inorgânicos, como água, dióxido de carbono e minerais, se denomina mineralização. Estes produtos finais, obtidos após uma biorremediação eficiente não são tóxicos e podem ser acomodados sem prejudicar o meio ambiente e os organismos vivos

Mesmo que parte significativa dos hidrocarbonetos presentes no meio ambiente seja biodegradável, as taxas de biodegradação estão limitadas por sua hidrofobicidade e baixa solubilidade em água (ALEXANDER, 1999). Em consequência, para melhorar o processo de biodegradação, tem sido desenvolvidas estratégias para aumentar a biodisponibilidade dos mesmos (VAN HAMME *et al*, 2003)<sup>fapesp</sup>

Entre as tecnologias estudadas está a utilização de surfactantes sintéticos. Os surfactantes, ou tenso-ativos são moléculas anfipáticas constituídas por uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica, capazes de reduzir a atividade superficial e interfacial entre líquidos, sólidos e gases, permitindo sua mistura ou dispersão como emulsão em água ou outros líquidos (BANAT *et al*, 2000). A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada e a porção polar pode ser não iônica, iônica ou anfotérica. A presença das duas porções em uma mesma molécula permite que o surfactante se distribua entre as fases fluidas com diferentes graus de polaridade. Os surfactantes exibem propriedades como adsorção, formação de micelas, formação de macro e micro emulsões, ação espumante ou antiespumante, solubilidade e detergência (DESAI & BANAT, 1997). Com a ação desses compostos, os microrganismos podem

transportar os contaminantes hidrofóbicos mais eficientemente para o interior de suas células e utilizá-los como fonte de carbono e, com isso, promover sua degradação (ATLAS e BARTHA, 1992).

Considerando-se o alto potencial dos biossurfactantes no aumento da biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo no meio ambiente, neste estudo foram conduzidos experimentos que pudessem avaliar o efeito de biossurfactantes ramnolipídicos, produzidos a partir de resíduos agroindustriais, na degradação de hidrocarbonetos de petróleo por consórcios microbianos. Tendo-se em conta as propriedades antimicrobianas destes produtos sobre cepas isoladas, será possível também obter-se informações sobre a aplicabilidade do produto no meio ambiente

Os biossurfactantes utilizados para os ensaios foram produzidos em nosso laboratório, através do cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*, isolada de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, utilizando-se diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono. O consórcio microbiano degradador de hidrocarbonetos de petróleo foi obtido através de um inóculo original de solo coletado de um sítio contaminado por resíduos de petróleo. Foram inicialmente caracterizadas as populações microbianas heterotróficas e degradadoras de hidrocarbonetos mediante a aplicação da técnica do número mais provável (NMP). Para tanto, 1 g de solo foi ressuspensa em 50 ml de meio mineral BHB (Busheela-Haas). A suspensão foi agitada em mesa agitadora com temperatura controlada por 12 horas a 37° C e 200 rpm. A partir da suspensão, foram enumeradas as populações heterotróficas e degradadoras de hidrocarbonetos. Para as heterotróficas foi utilizado um meio composto por bactopeptona. Para as degradadoras de hidrocarbonetos foi utilizado mesmo meio de cultivo BHB, porém com 1% de fonte de carbono.

Após a caracterização microbiológica do solo foi realizado um enriquecimento inoculando-se 500 µL da suspensão celular (utilizada para o NMP) em 50 ml de meio de cultivo BHB estéril contendo 0,1% (v/v) fonte de carbono esterilizado por autoclavagem. O enriquecimento foi subcultivado a cada 7 dias, transferindo-se 500 µL do cultivo envelhecido em 50 ml de novo meio de cultivo BHB com 0,1 % de fonte de carbono. A incubação foi realizada a 200 rpm e 30 °C na ausência de luz.

A capacidade degradadora do consórcio foi quantificada periodicamente, controles abióticos foram incluídos para determinar-se as perdas abióticas das fontes de carbono durante o período de incubação. Após o período determinado, foi realizada uma extração líquido-líquido dos cultivos, os extratos foram então analisados após fracionamento em coluna.

Os ensaios de biodegradação foram realizados em erlenmeyers, com B.H.B e fonte de carbono, separados em dois grupos com biossurfactante e sem biossurfactante Também foram incubados controles abióticos para verificação das perdas abióticas do hidrocarboneto de petróleo.

A incubação foi realizada em mesa agitadora com temperatura controlada por 10 e 20 dias, 30°C e 200 rpm.

A quantificação da população microbiana presente no consórcio foi realizada pela técnica do número mais provável (NMP) miniaturizado em placas de microtitulação, proposto por WREN e VENOSA (1996).

O presente projeto encontra-se em andamento com os consórcios sendo subcultivados e os resultados obtidos nos primeiros ensaios de biodegradação e capacidade degradadora estão sendo estudados e analisados.

## REFERENCIAS BIBLOGRAFICAS

ALEXANDER, M. Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, Inc, San Diego, 1999.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. **Advances Microbial Ecology**, v 12, p 287-338, 1992

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial application of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.53, p 495-508, 2000

FAPESP

- DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their comercial application. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, 47-74, 1997.<sup>FAPESP</sup>
- M.T. BALBA, N. AL-AWADHI, R. AL –DAHER. Biorremediation of oil-contaminated soil: microbiological for feasibility assement and field evaluation.**Jornal of Microbiological Methods** v.32p.155-164, 1998
- SHELL international Ltda 1983.The chemistry of petroleum .IN:.**The Petroleum Hand book** , 6<sup>TH</sup> ed .Elseiver, New York pp .223-264.
- VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology Molecular Biology Reviwes**, 67:503-549, 2003.
- WRENN, B.A.; VENOSA, A.D. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon-degrading bacteria by a most-probable-number procedure. **Canadian Journal of Microbiology**, 42:252-258, 1996<sup>FAPESP</sup>