



## PRODUÇÃO DE BIOFILME E EMULSIFICAÇÃO DE DERIVADOS DE PETRÓLEO POR CONSÓRCIOS BACTERIANOS ISOLADOS DE MANGUEZAL

Patricia Perez Oliveira<sup>1</sup>; Ana Beatriz de Araújo Xavier Freitas<sup>2</sup>; Natascha Krepsky Vinagre<sup>3</sup>;

<sup>1</sup>Graduanda em Ciências Ambientais do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.  
(oliveira.patricia.p@gmail.com)

<sup>2</sup>Graduanda em Ciências Ambientais do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>3</sup>Professora Adjunta do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro Rio de Janeiro, Brasil.

**Recebido em: 06/10/2012 – Aprovado em: 15/11/2012 – Publicado em: 30/11/2012**

### RESUMO

Com o aumento de despejos inadequados de petróleo em ambientes marinhos, por indústrias petrolíferas, torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas que possibilitem a minimização dos danos causados por estes poluentes. Uma destas técnicas é a biorremediação ambiental, onde microrganismos agem sobre o substrato oleoso, degradando-o biologicamente. Apesar deste método ser considerado promissor para remediação de áreas contaminadas por derivados de petróleo, algumas variáveis podem dificultar sua plena eficiência, tais como a indisponibilidade do hidrocarboneto à ação biológica e condições ambientais desfavoráveis à biodegradação. A produção de biossurfactante por microrganismos pode ser uma estratégia para reduzir tais dificuldades, emulsificando o óleo e facilitando a ação microbiológica. Além disso, a utilização deste metabólito no ambiente diminui a necessidade de adição de surfactantes sintéticos para o mesmo fim, diminuindo assim possíveis riscos à biota local. Este trabalho, por sua vez, tem por objetivo verificar a produção de biossurfactante e formação de biofilme em amostra coletada em local de mangue, propondo assim uma estratégia para biorremediação de ambientes contaminados por petróleo e seus derivados.

**PALAVRAS-CHAVE:** biorremediação, biossurfactante, biofilme, emulsificação.

### BIOFILM PRODUCTION AND EMULSIFICATION OF PETROLEUM DERIVATES BY BACTERIAL CONSORTIA ISOLATED FROM MANGROVE

### ABSTRACT

With the increase of inappropriate oil dump in marine ecosystems from oil companies it becomes necessary to develop techniques that allow the minimization of the

damages caused by these pollutants. One of these techniques is bioremediation, that allow the degradation of oil biologically, through microorganism action. Despite considered as a promising method for the treatment of impacted areas with oil and its derivatives, some variables, like the unavailability of hydrocarbons, can interfere in this process embarrassing the biological action and environmental conditions to biodegradation. The biosurfactant production can reduce some difficulty, once emulsifying the oil helps the microbiological action. Besides that the use of this metabolite in the ecosystem reduces the need of synthetic surfactant addition with the same objective but with less possible risks. The work has for objective to verify the production of biosurfactant and biofilm formation in collected sample on mangrove area. Proposing a strategy for bioremediation of environments contaminated with petroleum and his derivatives.

**KEYWORDS:** bioremediation, biosurfactant, biofilm, emulsification.

## INTRODUÇÃO

Historicamente o ambiente marinho foi local para descarte de resíduos decorrentes das atividades antrópicas, acreditando-se equivocadamente em sua alta capacidade de depuração. Também conhecidos como xenobiontes, entre os principais resíduos antrópicos que chegam às regiões costeiras pode-se citar os pesticidas e compostos relacionados, metais pesados, esgoto, lixo radioativo, efluentes térmicos e hidrocarbonetos de petróleo (PEIXOTO et al, 2011; NYBAKKEN, 1992; LALLI & PARSONS,1992).

Alguns xenobiontes podem se decompor naturalmente no ambiente ou ser atenuado no oceano, enquanto outros podem causar impactos significantes, mesmo que em pequenas concentrações. Entretanto, sabe-se que este processo, também conhecido como atenuação natural, pode muitas vezes, ser consideravelmente demorado, fazendo com que o ambiente impactado permaneça contaminado por longos períodos de tempo (CANTAGALO et al., 2007; WETLER-TONINI et al., 2011).

Além disso, o xenobiótico pode estar indisponível à biota local ou o ambiente estar desprovido de condições favoráveis para a atividade metabólica dos organismos biodegradadores, como pH, oxigênio dissolvido, nutrientes assimiláveis, entre outros (WETLER-TONINI, 2011, DASTGHEIB et al. 2012). Este trabalho dará enfoque à contaminação de ambiente de manguezal por derivados de petróleo.

A introdução antropogênica de hidrocarbonetos de petróleo nos oceanos pode ser resultante de vazamentos em plataformas de petróleo e de acidentes envolvendo navios tanque (NYBAKKEN, 1992). Independente da fonte de contaminação, o petróleo, por ser imiscível em meio aquoso, apresenta-se, inicialmente, indisponível à biodegradação, além de dificultar as trocas gasosas na interface água-ar (CANTAGALO et al., 2007; CANEIRO & GARIGLIO, 2010).

Os biossurfactantes, por sua vez, contribuem para a emulsificação da camada oleosa, facilitando a decomposição biológica desta. Além disso, sabe-se que a população bacteriana prioriza uma vida sedentária, associada a superfícies e outros organismos. Do ponto de vista ecológico, a colonização de superfícies é vantajosa, uma vez que direciona os microrganismos para locais específicos, possibilitando relações simbióticas, muito comuns na natureza (BONIN et al. 2001, DONLAN E

COSTERTON, 2002).

Biofilme pode ser definido como a comunidade estruturada de células bacterianas, dentro de uma matriz polimérica microbiana, aderida a uma superfície, inerte ou biológica, com taxa de crescimento e nível de transcrição diferente das bactérias livres (COSTERTON, 1999). A Matriz do biofilme funciona como proteção contra antimicrobianos naturais, amebas, surfactantes, substâncias tóxicas e ameaças ambientais. Apresenta também um papel importante como meio de comunicação entre os microrganismos, por garantir a proximidade de grupos fisiológicos dependentes metabolicamente (MEYER-REIL, 1994; DUNNE, 2002; DONLAN e COSTERTON, 2002).

Ao processo de remediação de um local impactado, a partir da ação de microrganismos, dá-se o nome de biorremediação ambiental (CANTAGALLO, et al. 2007; HASSANSHAHIAN et al. 2012). Esta, por sua vez, apresenta uma baixa interferência no ecossistema, quando comparada a outras técnicas de remediação, como introdução de dispersantes químicos e remoção manual. Portanto, esta baixa interferência a torna uma técnica com maior viabilidade para recuperação de ecossistemas como manguezais, conhecidamente sensíveis à situações adversas.

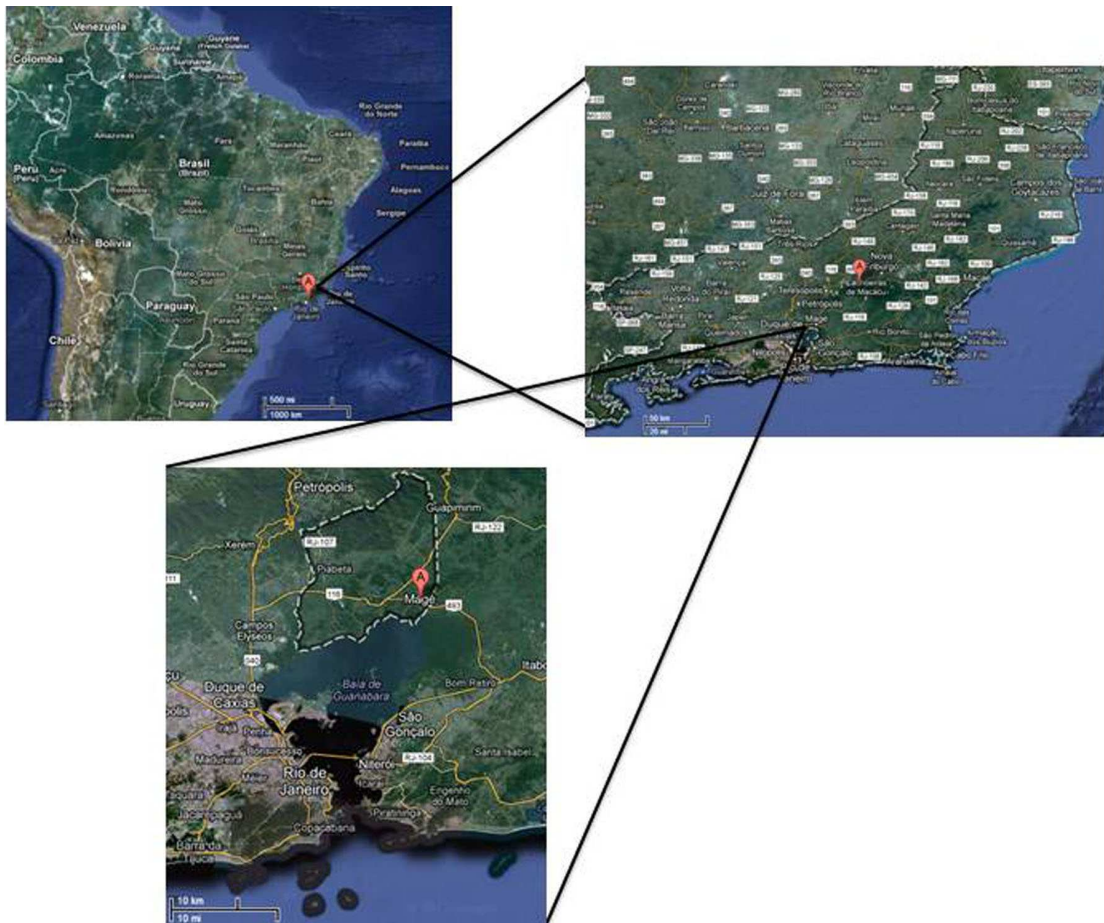
Apesar de estudos recentes com relação a manguezais impactados (PEIXOTO et al. 2011; SANTOS et al. 2011) esta técnica ainda é pouco estudada. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi isolar consórcios bacterianos de sedimento de mangue para estudar a emulsificação de derivados do petróleo e produção de biofilme.

## **METODOLOGIA**

### **Local de coleta**

A coleta do sedimento para isolamento de consórcios bacterianos foi realizada na área de manguezal localizada na Praia de Mauá. Situado no município de Magé, Rio de Janeiro, Brasil (Figura 1), este mangue encontra-se no entorno da Baía de Guanabara, localizada na porção central do litoral fluminense, sendo delimitada, aproximadamente, pelas latitudes 22°40' S e 23°00' S e pelas longitudes 43°00' W e 43°20' W (SOARES, et al, 2003).

A chegada de petróleo no manguezal ocorreu em detrimento, principalmente, de vazamento na Refinaria de Duque de Caxias (Reduc) em Janeiro de 2000. Houve o rompimento de oleodutos, despejando na Baía de Guanabara aproximadamente 1.200 mil litros de óleo (equivalente a 8.000 barris) (BERTOLI & RIBEIRO, 2006).



**FIGURA 1:** Imagem de satélite detalhando a área (ponto A) onde foram coletados os consórcios deste estudo. (FONTE: <https://maps.google.com.br/>)

### **Coleta e manutenção das amostras**

Foram coletadas amostras de sedimento em três pontos do manguezal da Praia de Mauá. Dez gramas de cada um dos três pontos foram pesados, em condições assépticas, e colocados em 100 mL de caldo nutriente salgado, constituído de peptona de carne (g), extrato de carne (g), cloreto de sódio (g) e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (mL), solubilizados em água destilada (mL), na proporção 5:3:50:1, em um volume de solução de 1000mL. As amostras foram incubadas a 37°C por 20 dias e 0,5 mL de Petróleo API 28° foi adicionado na amostra Mangue 2 para estimular a produção de surfactante neste consórcio. Os consórcios bacterianos resultantes desta incubação foram utilizados para os experimentos descritos a seguir.

### **Teste do colapso da gota de petróleo**

Após 20 dias de incubação das amostras foi realizado o teste do colapso da gota. Para tal, 5,0 mL de cada caldo com crescimento bacteriano foi colocado em placas de Petri e posteriormente, adicionou-se 0,05 ml de Petróleo API 28°. Os resultados da dispersão da gota de petróleo em cada uma das amostras foram comparados com o caldo sem crescimento bacteriano (controle -) e com o meio de cultura contendo 0,5 mL de n-lauril sarcosinato de sódio 1 ppm (controle +).

### **Taxa de emulsificação da gasolina**

Para a taxa de emulsificação foram adicionados 6 mL de gasolina comum em tubos de ensaio contendo 4 mL de meio de cultura com 48h de crescimento bacteriano. Os tubos foram agitados durante 1 minuto em vórtex e a leitura foi realizada após repouso de cinco dias.

O cálculo da taxa de emulsificação foi modificada de PARASZKIEWICZ et al., (2002) conforme a fórmula apresentada a seguir:

$$TE_O = ((HE/HT)*100) - TE_B$$

Onde:

TE<sub>O</sub> – taxa de emulsificação na camada oleosa (gasolina)

HE = altura total da camada de emulsão

HT = altura total do caldo nutriente e gasolina

TE<sub>B</sub> – taxa de emulsificação do ensaio com branco (emulsão na fase aquosa – meio de cultura sem crescimento bacteriano)

### **Quantificação de biofilme**

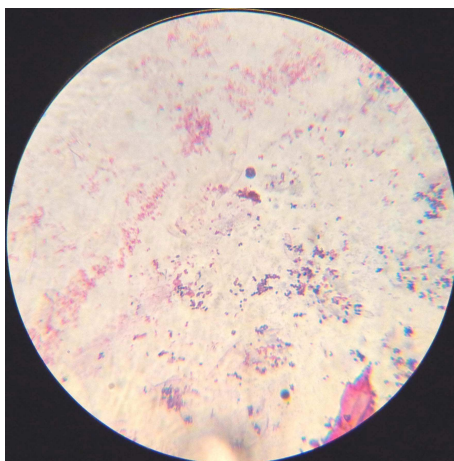
Para quantificação do biofilme produzido, 200 µL de caldo com crescimento bacteriano foram distribuídos em 5 poços de microplaca de poliestireno com 96 poços e incubadas por 5 dias a 37°C. Após incubação, cada orifício foi lavado duas vezes com 200 µL de PBS (pH 7,2), sendo posteriormente corados com 100 µL de safranina a 0,1% durante 30 segundos. O corante foi retirado e os orifícios lavados com 200 µL de PBS. A placa então foi invertida para secagem a temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado a cada orifício 100 µL de solução de 97% de etanol e 3% de éter etílico e o volume completado com 100 µL de PBS. A leitura da densidade ótica (D.O.) foi realizada no comprimento de onda de 492nm em leitor de microplacas para teste de ELISA, modelo Polaris (KREPSKY et al. 2003). A partir da leitura os consórcios foram classificadas como fortemente produtores de biofilme (D.O. ≥0,5), moderadamente produtores (0,1<D.O.<0,4) ou fracamente produtores (D.O. ≤0,1).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Consórcios bacterianos**

Nos três pontos do sedimento coletado, apresentaram crescimento de consórcios de bactérias. A existência de consórcios foi confirmada através da coloração de Gram em microscopia ótica. Os consórcios bacterianos apresentaram bactérias gram positivas e gram negativas de variadas morfologias (cocos, bastonetes, víbrios e espirilos) (Figura 2). Os consórcios foram registrados no laboratório como Mangue 1, Mangue 2 e Mangue 3.

Na tentativa de isolar as colônias dos consórcios para identificação individual foi verificada uma alteração nas propriedades emulsificantes destas. Portanto, optou-se por trabalhar com as bactérias em consórcio. Segundo DUNNE (2002), a estratégia de microrganismos ambientais se organizarem em consórcios permite que uma variedade de enzimas atue na decomposição de substratos dissolvidos e particulados, além da presença de aceptores finais de elétrons alternativos em caso de anaerobiose.



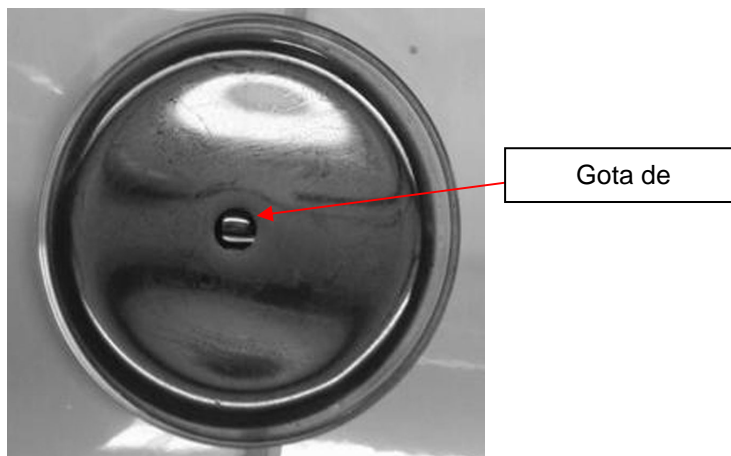
**FIGURA 2:** Imagem de microscopia óptica, mostrando a coloração de Gram de consórcio bacteriano estudado.

### **Teste do colapso da gota de petróleo**

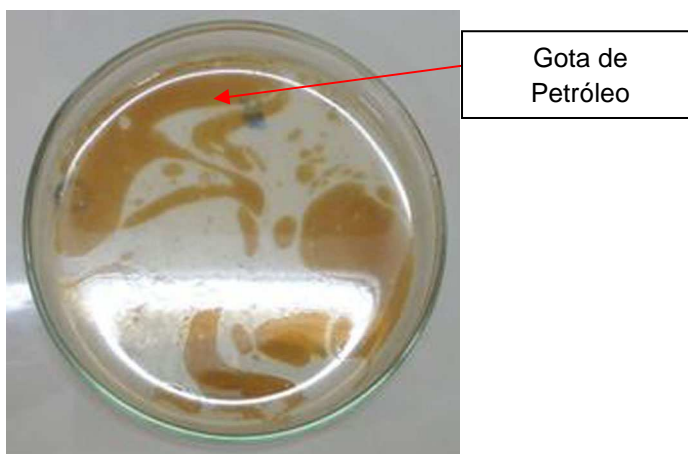
Nas Figuras 3, 4 e 5 estão apresentadas os resultados do colapso da gota para o consórcio Mangue 2 (M2), controle positivo e controle negativo, respectivamente.

Os resultados sugerem a produção de biossurfactante nos três consórcios estudados.

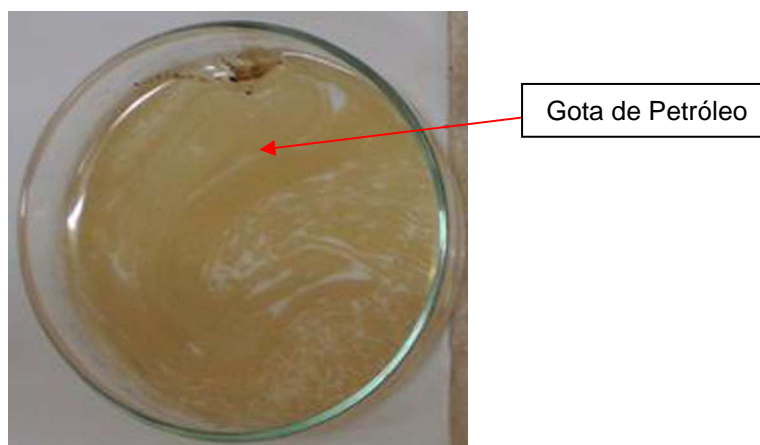
Ao contrário do observado no controle negativo (rápida dispersão da gota por toda a superfície do caldo – Figura 5), quando a gota de óleo foi adicionada ao meio de cultura contendo amostra do consórcio bacteriano não houve dispersão da gota (Figura 3). Da mesma forma, no controle positivo com surfactante, não foi observada a dispersão da gota de óleo pelo caldo. A dispersão na presença do surfactante foi limitada mesmo após a tentativa de homogeneização por movimentação circular da placa.



**FIGURA 3:** Teste colapso da gota. A imagem mostra placa de Petri contendo o consórcio M2 em caldo nutriente salgado após adição de gota de petróleo. A cor escura do meio deve-se à presença de sedimento de manguezal em suspensão.



**FIGURA 4:** Teste do colapso da gota. A imagem mostra placa de Petri com o controle positivo contendo caldo nutriente salgado e 0,5 mL de n-lauril sarcosinato de sódio 1 ppm após adição de uma gota de petróleo e homogeneização.

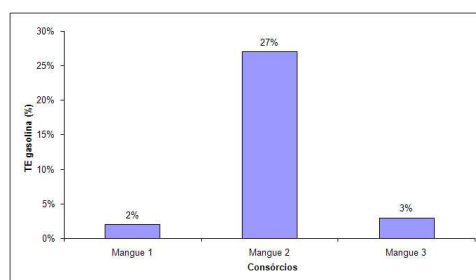


**FIGURA 5:** Teste do Colapso da gota. A imagem da placa de Petri com controle negativo contendo caldo nutriente salgado e gota de petróleo.

### **Emulsificação da gasolina**

O resultado da taxa de emulsificação da gasolina está apresentado na Figura 6. Foi observada a formação de microemulsões na interface água-óleo. Como pode ser observado nos resultados o consórcio Mangue 2 obteve maior taxa de emulsificação (27%) comparada às outras amostras. É possível dizer, portanto, que a adição de petróleo ao consórcio bacteriano estimulou a produção de biossurfactante pelo mesmo, tornando o componente oleoso disponível à ação da

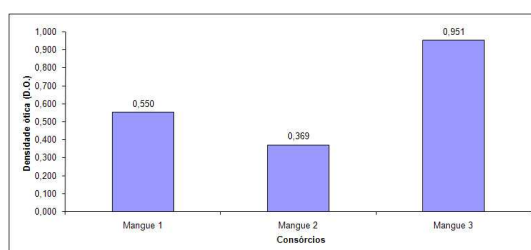
microbiota, possibilitando, também, que a troca gasosa seja feita pela interface do meio. Pode-se então dizer que o biossurfactante produzido poderia ser utilizado para emulsificar hidrocarbonetos de petróleo tanto na fase hidrofóbica quanto na fase hidrofílica. Em acordo com o resultado, outros estudos como os de KREPSKY et al. (2007), MUKHERJEE et al. (2008) e DASTGHEIB et al. (2012) mostram que é possível estimular a produção de surfactante por bactérias marinhas através dos nutrientes fornecidos no meio de cultura.



**FIGURA 6:** Comparação da taxa de emulsificação da gasolina entre os consórcios Mangue 1, Mangue 2 e Mangue 3.

### Produção de biofilme

Os resultados para este teste estão apresentados na Figura 7. A partir dos resultados, foi observado que as amostras não submetidas ao petróleo foram consideradas fortemente produtoras de biofilme. O consórcio bacteriano da Mangue 2, apresentou moderada produção de biofilme (D.O. 0,369), indicando que o consórcio presente neste ambiente possui grande capacidade de resistência à poluição por derivados de petróleo. O estresse causado pela presença de petróleo parece favorecer a produção de surfactante em detrimento da produção de biofilme.



**FIGURA 7:** Produção de biofilme nos consórcios estudados quantificada através da leitura de densidade ótica (D.O.) em microplacas.

A associação entre a capacidade de produção de biossurfactante e a formação de biofilme, por consórcios microbianos, é uma estratégia muito interessante para a otimização do processo de biorremediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo (SATPUTE et al. 2010). Isso se dá devido à disponibilização do óleo à ação microbiológica, por meio da emulsificação da camada hidrofóbica, juntamente com a agregação de uma comunidade microbiana resistente a condições ambientais desfavoráveis próxima à superfície do contaminante.



## CONCLUSÕES

Foi possível concluir que os consórcios bacterianos encontrados no manguezal do estudo apresentam resistência à compostos oleosos. Além disso, com a adição de petróleo no meio, a microbiota intensifica a produção de biossurfactante. A produção de biofilme parece ter sido afetada negativamente pela incubação dos consórcios na presença de petróleo. Os resultados apresentados sugerem que os consórcios bacterianos isolados neste estudo tem potencial para biorremediação de ambientes contaminados por derivados de petróleo.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com recursos disponibilizados através do auxílio instalação da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ e bolsa de iniciação científica UNIRIO/PIBIC. As autoras são gratas à Erian Ozório e a equipe do Projeto Mangue Vivo da Fundação Onda Azul pelo suporte à coleta.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTOLI, A.L.; RIBEIRO, M. de S.. Passivo Ambiental: Estudo de caso da Petróleo Brasileiro S.A – Petrobrás. A repercussão ambiental nas demonstrações contábeis, em consequência dos acidentes ocorridos. **Revista de Administração Contemporânea**, v. 10, nº2, p. 117-136, abr/jun 2006.

BONIN, P.; RONTANI, J. F.; BORDENAVE, L. Metabolic differences between attached and free-living marine bacteria: inadequacy of liquid cultures for describing in situ bacterial activity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 194, p. 111-119, 2001.

CANTAGALLO, C.; MILANELLI, J. C. C.; DIAS-BRITO, D. Limpeza de ambientes costeiros brasileiros contaminados por petróleo: uma revisão. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 2, nº1, 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**, v. 3, nº4, mai. 2010.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. **Bioresource technology**, v. 100, n. 2, p. 1015-9, jan 2009.

DASTGHEIB, S. M. M.; AMOOZEGAR, M. A.; KHAJEH, K.; SHAVANDI, M.; VENTOSA, A. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halophilic microbial consortium. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 95, n. 3, p. 789-98, ago 2012.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 167-193, 2002.

DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 155-166, 2002.

HASSANSHAHIAN, M.; EMTIAZI, G.; CAPELLO, S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and Caspian Sea. **Marine Pollution Bulletin**, 64, p.7-12, 2012.

KREPSKY, N. ; FERREIRA, R. B. R.; NUNES, A. P. F.; ; LINS, U. G. C; ; FILHO, F. C. S.; ; MATTOS-GUARALDI, A. L. de; NETTO-DOSSANTOS, K. R. Cell Surface Hydrophobicity and Slime Production of Staphylococcus epidermidis Brazilian Isolates. **Current Microbiology**, v. 46, n.4, p. 280-286, 2003.

KREPSKY, N.; DA SILVA, F. S. ; FONTANA, L. F. ; CRAPEZ, M. A. C. . Alternative methodology for isolation of biosurfactant-producing bacteria. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, p. 117-124, 2007.

LALLI, A. M.; PARSONS, T. R. Human Impacts on Marine Biota. In: Biological oceanography an introduction. **The Open University**, p. 248-263,1992.

MEYER-REIL, L.A. Microbial life in sedimentary biofilms – the challenge to microbial ecologists. **Marine Ecology Progress**, ser 112, p. 303-311, 1994.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SIVAPATHASEKARAN, C.; SEN, R. Enhanced production of biosurfactant by a marine bacterium on statistical screening of nutritional parameters. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, n. 3, p. 254-260, dez 2008.

NYBAKKEN, J. W. **Human impact on sea**. In: Marine Biology an ecological approach. p. 418-445, 1992.

PARASZKIEWICZ, K., KANWAL, A., DLUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. **Journal of Biotechnology**, v. 92, p. 287- 294, 2002.

PEIXOTO, R. CHAER, G. M.; CARMO, F. L.; ARAÚJO, F. V.; PAES, J. E.; VOLPON, A.; SANTIAGO, G. A.; ROSADO, A. S. Bacterial communities reflect the spatial variation in pollutant levels in Brazilian mangroves sediment. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 99, p. 341-354, 2011.

SANTOS, H.F.; CARMO, F. L.; PAES, J. E.; ROSADO, A. S.; PEIXOTO, R. S. Bioremediation of Mangroves Impacted by Petroleum. **Water, Air & Soil Pollution**, 216, p.329-350, 2011.

SATPUTE, S. K.; BANAT, I. M.; DHAKEPHALKAR, 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.

SOARES, M. L. G., Chaves, F. O., Corrêa, F. M., Júnior, C. M. G. S. **Diversidade estrutural de bosques de mangue e sua relação com distúrbios de origem antrópica**: o caso da Baía de Guanabara ( Rio de Janeiro ). Anuário do Instituto de Geociências, UFRJ. 26, 101-116, 2003.

WETLER-TONINI, R. M. C.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Biodegradação bacteriana de Petróleo e seus derivados. **Revista Virtual de Química**, v. 3, nº2, p. 78-87, jun. 2011.