

# ISOLAMENTO, SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS EM SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS CONTAMINADOS

Ketlyn Luize FIORAVANTI <sup>1</sup>Joil José CELINO <sup>2</sup>Juan Carlos ROSSI-ALVA <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Bióloga, aluna do curso de Mestrado em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente – POSPETRO, Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia - IGEO/UFBA. E-mail: ketlynfioravanti@gmail.com

<sup>2</sup> Geólogo. Dr. Geologia Regional. Professor Associado. Núcleo de Estudos Ambientais – NEA/IGEO/UFBA. E-mail: joil@ufba.br

<sup>3</sup> Biólogo. Dr. Bioquímica. Professor Adjunto da Universidade Católica do Salvador – UCSAL. E-mail: jcrossi@ucsal.br

**RESUMO.** Com o intuito de isolar, selecionar e identificar microrganismos nativos de sedimentos de manguezais contaminados por petróleo e seus derivados, foram coletadas amostras em 06 pontos de regiões pertencentes ao setor petrolífero ao norte da Baía de Todos os Santos (Bahia, Brasil). O enriquecimento das amostras ocorreu em meio mineral Buschnell Haas juntamente com 1% de petróleo, óleo diesel ou gasolina como fonte de carbono. No total isolou-se 306 microrganismos: bactérias (67%), leveduras (29%) e fungos filamentosos (4%). A área de refino apresentou o maior número de microrganismos isolados, principalmente bactérias com o uso do petróleo como fonte de carbono, seguido pela área de transporte. Algumas das bactérias não fermentadoras identificadas foram: *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas matophilia*. Conclui-se que existe uma grande quantidade e diversidade de microrganismos isolados com padrões de crescimento diferenciados a depender da atividade petrolífera na área e das fontes de carbono utilizadas.

**Palavras-chaves:** Biorremediação; bioaumento; bioestímulo; microbiologia e *Pseudomonas sp.*

**ABSTRACT. isolation, selection and identification of the microorganisms to degradation of oil and derivatives in contaminated sediments from mangrove.** In order to isolate, select and identify microorganisms native sediments contaminated by petroleum and its derivatives in mangroves, samples were collected in 06 points belonging of the oil sector at the north of the Todos os Santos Bay (Bahia, Brazil). The enrichment of samples occurred in Buschnell Haas mineral medium with 1% oil, diesel or gasoline as the carbon source. In total 306 isolated microorganisms: Bacteria (67%), yeast (29%) and filamentous fungi (4%). The refining area has the largest number of microorganisms, mainly bacteria with oil used as a carbon source, followed by transportation area. Some non-fermenting bacteria were identified as *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas matophilia*. There is a large number and diversity of microorganisms with different growth patterns depending on the oil activity in the area and carbon sources used.

**Keywords:** Bioremediation; bioaugmentation, biostimulation, microbiology and *Pseudomonas sp.*

## INTRODUÇÃO

O petróleo é um líquido viscoso, constituído principalmente por carbono e hidrogênio. É um composto formado por um grande número de hidrocarbonetos alifáticos, alicíclicos e aromáticos usados no processo industrial para obtenção de óleo combustível, gasolina, parafina, medicamentos, entre uma variedade de outros produtos. Com o desenvolvimento das cidades, aumentaram-se os estoques de petróleo bem como o seu transporte mundial, sendo potencial o risco de acidentes envolvendo derrames de óleo no meio ambiente (HARAYAMA et al., 1999; PEREIRA et al., 2009; BASTOS; FREITAS, 2010; SANTOS et al., 2011).

Pelo fato do petróleo bruto ou derivado consistir de diferentes classes de hidrocarbonetos, propicia o crescimento de vários grupos bacterianos, especializados em

compostos preferenciais (YAKMOV et al., 2005). Algumas populações bacterianas ao entrar em contato com o petróleo derramado sofrem um processo de adaptação, reconhecendo seus componentes como fonte de carbono e energia iniciando assim o processo de degradação (CRAPEZ et al., 2002).

Nos oceanos, o petróleo derramado é carregado para ecossistemas costeiros a exemplo dos manguezais. Em condições ambientais satisfatórias ao seu crescimento e desenvolvimento, os microrganismos providenciam uma vasta gama de serviços, dentre eles a biorremediação, alternativa promissora para recuperação de áreas impactadas. Muitos grupos bacterianos presentes nos sedimentos dos manguezais, tais como *Pseudomonas*, *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Microbulbifer*, *Sphingomonas*, *Micrococcus*, *Gordonia* entre outros, são capazes de degradar hidrocarbonetos

de petróleo (BRITO et al., 2006; SANTOS et al., 2011).

Ao longo da história, a Baía de Todos os Santos (BTS) foi cenário de diversos ciclos econômicos, iniciando com o do pau-brasil até alcançar o ciclo do petróleo, da indústria de transformação e da indústria petroquímica. Desde o ano de 1950 estão instaladas na BTS atividades ligadas à indústria petrolífera, sendo alvo de inúmeros acidentes ambientais envolvendo derramamento do óleo (GERMEN, 1997; VEIGA, 2003). A BTS também vem sendo alvo de acidentes relacionados com derramamento de petróleo ou seus derivados.

Os municípios de São Francisco do Conde, Madre de Deus e Candeias representam importantes componentes estuarinos da Baía de Todos os Santos – BTS. Nestas regiões concentram-se atividades de produção, transporte e refino de petróleo (Fig.1B), acarretando em despejos tóxicos responsáveis por um dos maiores focos de poluição da BTS. São carentes na literatura informações sobre a diversidade microbiana dos manguezais da BTS que podem ser utilizados em processos de biorremediação de áreas impactadas por atividades petrolíferas. Diante desta problemática buscou-se isolar, utilizando diferentes fontes de carbono, microrganismos nativos de sedimentos de manguezais contaminados por petróleo e seus derivados das três regiões acima citadas, bem como do rio Jequitinhonha (RJ) localizado no município de Belmonte, no Sul da Bahia (Fig. 1A),

como área referência, sem histórico de contaminação por hidrocarbonetos.

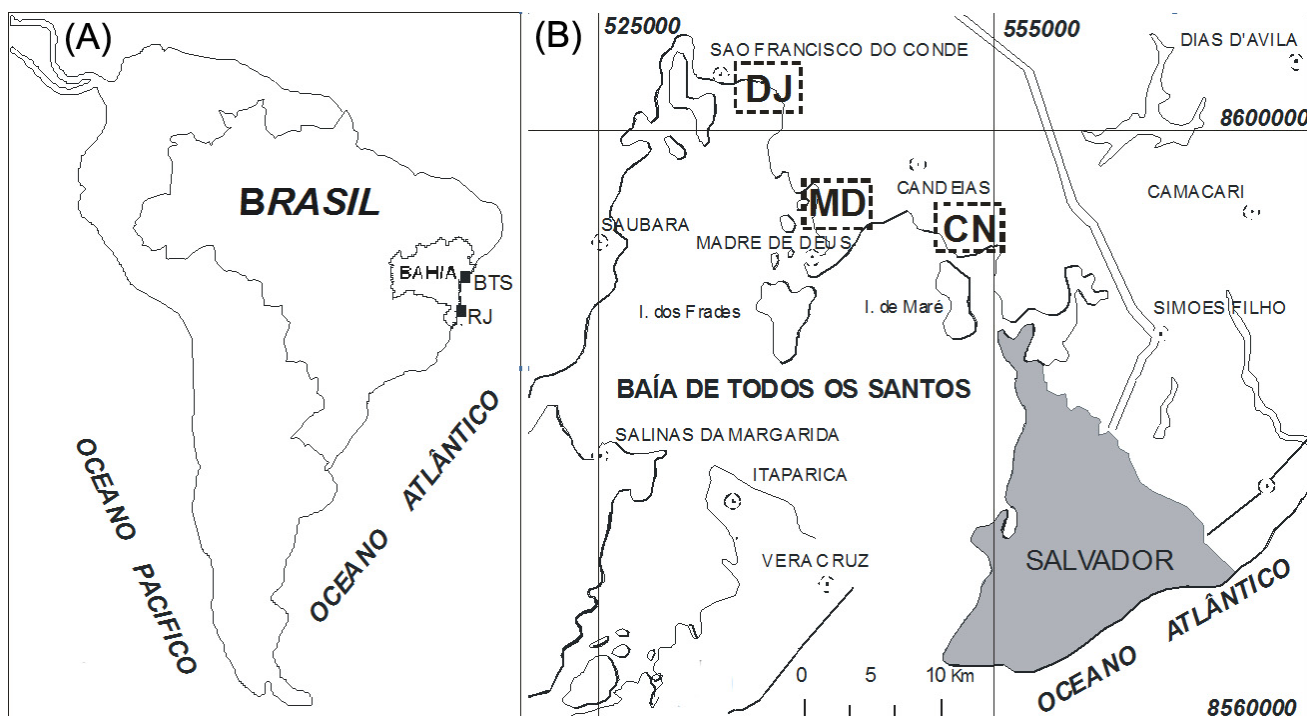
## MATERIAIS E MÉTODOS

Para efeito de referência e comparação dos dados foi escolhida uma estação no rio Jequitinhonha (RJ), município de Belmonte localizada no extremo Sul da Bahia (Figura 1A) com a coleta de sedimento de fundo (Figura 2A). Até o presente momento não existem campos de exploração de petróleo na região Sul da Bahia, sendo realizados estudos por empresas do setor petrolífero para avaliar a presença de petróleo e gás na região (SILVA; 2008).

As demais regiões de estudo estão inseridas na Baía de Todos os Santos – BTS, que corresponde a segunda maior baía brasileira (HATJE; ANDRADE, 2009) (Figura 1B).

Na BTS foram selecionadas três regiões pertencentes a setores distintos da cadeia produtiva do petróleo, a saber: campo de produção de petróleo, terminal portuário e refinaria. Em cada localidade foi realizada uma amostragem do sedimento superficial do manguezal em dois pontos distintos, totalizando seis pontos de amostra. A localização dos pontos foi baseada em observações feitas em imagens de satélite e mapas obtidos pelo Google Earth, fotos aéreas, folha Baía de Todos os Santos na escala de 1:100.000 (folha SD-24-X-A-IV), localização por GPS (Sistema de Posicionamento Global) e tábua de maré do porto de Madre de Deus.

**Figura 1.** (A) Mapa de situação e localização do rio Jequitinhonha (RJ) e da Baía de Todos os Santos (BTS) (B) com os locais de coleta de sedimentos e as respectivas atividades petrolíferas para as áreas de manguezal de Dom João (DJ - Extração), Madre de Deus (MD - Transporte) e Candeias (CN - Refinaria), Bahia - Brasil.



Nos anos 50, em uma área de 30 Km<sup>2</sup> a 40 Km de Salvador, foi inaugurado o campo de Dom João. Pertencente aos arenitos da Bacia de Sergi, na Bacia do Recôncavo e apresentando inicialmente 634 é o primeiro campo de petróleo submarino brasileiro (VEIGA, 2003).

O campo de Dom João (DJ) está localizado no município de São Francisco do Conde (Figura 2 B). No primeiro ponto (DJ01) a coleta foi feita nas proximidades de planície hiper-salina (*apicum*) cercado por tanques de armazenamento de óleo e maquinários da PETROBRÁS. No segundo ponto (DJ02), a coleta foi realizada nas proximidades do rio Dom João, ao lado de um poço de petróleo inativo.

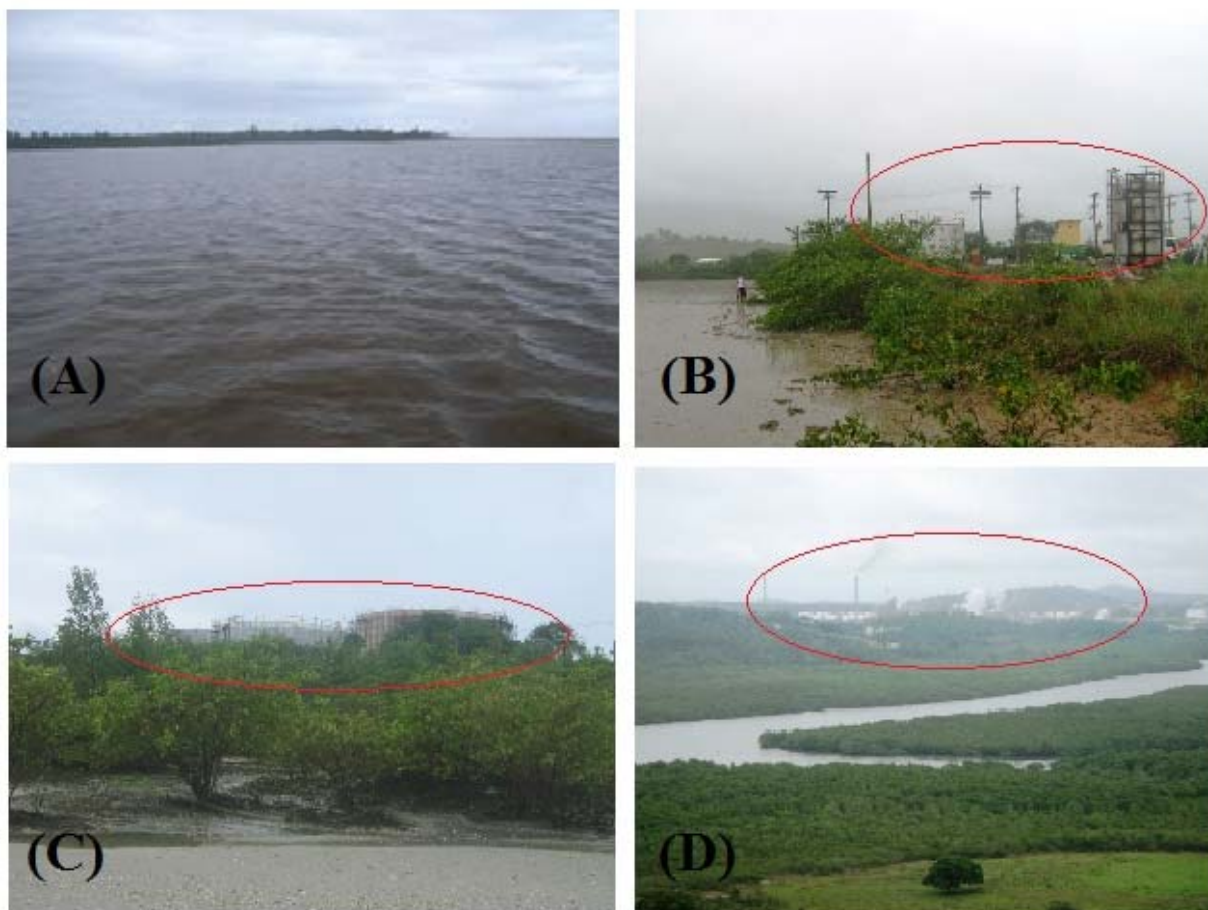
O Terminal Almirante Alves Câmara - TEMADRE é considerado o segundo terminal portuário mais importante da PETROBRÁS, sendo subsidiada pela TRANSPETRO. É responsável pelo transporte marítimo de óleo e derivados. O TEMADRE possui 45 tanques de armazenamento de petroderivados e recebe em média 45 navios petroleiros por mês, além de bombear gasolina, GLP, diesel e álcool por meios de oleodutos para cidades do interior da Bahia (VEIGA, 2003).

A segunda amostragem foi em Madre de Deus (MD). No terceiro ponto (MD03), o manguezal estava adjacente aos dutos e tanques de armazenamento do TEMADRE ao lado direito do cais das pequenas embarcações. A coleta do quarto ponto (MD04) foi do lado esquerdo do cais, também próximo aos dutos e tanques de armazenamento do terminal portuário (Figura 2C).

No município de Candeias encontra-se uma região de produção da Petrobrás denominada Pedra Branca, nas proximidades da RLAM (CELINO et al., 2007). A RLAM está inserida em uma região de manguezal, no município de São Francisco do Conde, a 56 Km da capital Salvador. É considerada a primeira refinaria brasileira tendo sido inaugurada no dia 17 de setembro de 1950 (VEIGA, 2003).

A terceira amostragem foi no município de Candeias (CN), no manguezal situado próximo à estação de produção de Pedra Branca, à Refinaria Landulpho Alves Mataripe - RLAM e ao Laboratório de Simulação de Processos de Biorremediação, unidade do Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO) NEA/IGEO/UFBA. Nessa localidade as amostras foram coletadas nos pontos 05 e 06 (CN05 e CN06) (Figura 2D).

**Figura 2.** Fotografias das áreas de estudo. (A) – Rio Jequitinhonha em Belmonte, (B) Planície hiper-salina (*apicum*) no campo de Dom João, destaque para os maquinários da Petrobrás, (C) manguezal em Madre de Deus com visualização dos tanques de armazenamento de petróleo e derivados do TEMADRE e (D) Rio São Paulo em Candeias, com destaque para a RLAM ao fundo.



A amostra referência (RJ) foi coletada em maré baixa, período seco e em profundidade aproximada de 5m. As amostras da BTS foram coletadas em maré baixa, período chuvoso, sendo apenas de sedimentos superficiais (0,0 a 5,0 cm) em região de inter-maré (CELINO; QUEIROZ, 2006).

Em Belmonte os parâmetros físico-químicos pH, Eh, condutividade, temperatura e salinidade foram mensurados *in situ* no rio Jequitinhonha, já na BTS estes foram mensurados em corpos d'água próximos aos pontos de coleta.

Cada ponto amostrado foi percorrido em sua extensão, sendo feita busca visual de locais com possíveis contaminações por petróleo ou seus derivados. Foram observadas poças de água contendo manchas de óleo e tocas de caranguejo com presença de material orgânico.

Cerca de 50g de cada amostra foi coletada aleatoriamente por meio de frascos de vidro lavados com Extran neutro a 5% em banho durante 24 horas, enxaguados com água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C durante 20 minutos. Após a coleta os frascos foram acondicionados em uma caixa de isopor contendo gelo até a chegada ao laboratório para a realização dos demais procedimentos.

#### Fontes de Carbono

As fontes de carbono utilizadas no experimento laboratorial (petróleo, óleo diesel e gasolina) foram cedidas pela Refinaria Landulpho Alves Mataripe – RLAM. Todas as amostras, já refinadas, foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar.

#### Isolamento dos Microrganismos Hidrocarbonoclasticos

As atividades envolvendo o experimento microbiológico foram realizadas no Laboratório de Estudos em Meio Ambiente – LEMA, localizado na Universidade Católica do Salvador, Salvador, Bahia. Para a execução do experimento cada amostra foi pesada três vezes consecutivas, contendo 10g de sedimento cada, totalizando 3 amostras da área referência (RJ) e 18 da BTS (Figura 3A). Cada amostra obtida foi enriquecida em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 99 mL do meio mineral Buschnell Haas (BH), marca Difco, juntamente com 1% de petróleo, óleo diesel ou gasolina como única fonte de carbono e energia para o crescimento dos microrganismos (Figura 3A) (Tabela 1). Uma amostra RJ e uma BTS foram utilizadas como controle, sem adição de fontes de carbono durante o período de enriquecimento. Os frascos foram então submetidos à agitação em shaker rotativo (marca Tecnal) à 180 rpm ( $\pm$ ) 2 e temperatura de 28°C ( $\pm$ ) durante 21 dias (Figura 3B) (CHAERUN et al., 2004; SOUZA et al., 2005).

**Tabela 1.** Composição do meio BH.

Componente	Quantidade (g/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,20
FeCl <sub>3</sub>	0,05
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0,02
<b>Estado Sólido</b>	
Ágar agar	20,0

Após 8, 15 e 21 dias de enriquecimento um isolamento foi realizado em placas de Petri contendo meio BH solidificado para o crescimento dos microrganismos hidrocarbonoclasticos.

Os frascos Erlenmeyers foram homogeneizados e uma alíquota de amostra correspondente a uma alçada abundante foi retirada e semeada nas placas de Petri em duplicata (Figuras 3C e 3D). As fontes de carbono correspondentes ao período de enriquecimento foram adicionadas sobre a amostra semeada, com exceção da gasolina que foi adicionada na tampa da placa e dos controles que não houve adição de fontes de carbono (Figuras 3E e 3F). As placas foram encubadas em estufa a 30°C durante 4 dias para o crescimento dos microrganismos hidrocarbonoclasticos.

Observaram-se os padrões de crescimento dos microrganismos nas placas contendo Agar BH. Os microrganismos com características semelhantes às bactérias foram transferidos para placas de TSA (Tryptic Soy Agar), marca Himedia e os semelhantes aos fungos filamentosos e às leveduras foram transferidos para placas de Agar Sabouraud, marca Himedia (Tabela 2). As placas foram incubadas durante 48 horas, sendo as de TSA à 35°C e as de Agar Sabouraud à 30°C. A cada 30/45 dias repiques consecutivos foram realizados para a manutenção dos isolados.

**Tabela 2.** Composição dos meios TSA e Agar Sabouraud.

Componente	Quantidade (g/L)
<b>TSA</b>	
Peptona de Caseína	15,0
Peptona de Soja	5,0
Cloreto de Sódio	5,0
Ágar agar	15,0
<b>Agar Sabouraud</b>	
Peptona de carne	10,0
Glicose	40,0
Ágar agar	15,0

#### Ensaio de Seleção

Os ensaios de seleção foram realizados com a finalidade de verificar o potencial de degradação dos microrganismos isolados com o uso do petróleo como fonte de carbono em até 24 horas. Os ensaios foram executados apenas com as bactérias isoladas das amostras da BTS.

**Figura 3.** Procedimentos microbiológicos. (A) – Enriquecimento das amostras em 99 mL de caldo BH e 1% de um dos petroderivados como fonte de carbono; (B) – Amostras submetidas à agitação em 180 rpm,  $28\pm 2$  durante 21 dias; (C) – Obtenção das amostras enriquecidas; (D) – Semeadura das amostras enriquecidas em placas com ágar BH; (E) – Adição do petróleo e óleo diesel sobre a amostra semeada; (F) – Adição da gasolina na tampa da placa de Petri.



Para o reestabelecimento do metabolismo microbiano as cepas foram reativadas em caldo Mueller Hinton a  $35^{\circ}\text{C}$  por 48 horas e posteriormente transferidas para placas de TSA sob as mesmas condições de crescimento. Após a reativação as cepas foram padronizadas em suspensão microbiana de  $1,5 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por meio do tubo 0,5 da escala de MacFarland.

Visando restringir as bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo foi realizado um ensaio de seleção inicial utilizando

placas multipoços com capacidade de 2,0 mL. Para tal, segundo metodologia de Hanson et al. (1993), foram adicionados  $500\mu\text{L}$  do meio BH,  $50\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana padronizada em  $1,5 \times 10^8$  UFC,  $20\mu\text{L}$  da fonte de carbono (petróleo) e  $10\mu\text{L}$  do indicador 2,6 diclorofenol-indofenol – DCPIP (Figuras 4A e B). Executou-se um controle abiótico, contendo todos os itens acima citados com exceção da suspensão bacteriana. A placa foi incubada à temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ , durante 24 horas.

**Figura 4.** Ensaio de Seleção. (A) Preparo da Suspensão bacteriana padronizada em  $1,5 \times 10^8$  UFC. (B) – Placa multipoço utilizada no primeiro ensaio de seleção. (C) – Cepa enriquecida em caldo BH e fonte de carbono em agitação a 180 rpm,  $28\pm 2$  e 17 horas. (D) – Adição do indicador 2,6 DCPIP.



O indicador 2,6 DCPIP age como acceptor de elétrons atuando no sentido de indicar o potencial das cepas bacterianas em utilizar os hidrocarbonetos de petróleo como substrato por meio da alteração do meio da forma oxidada (azul) para reduzida (incolor) (AFUWALE; MODI, 2012).

Um segundo ensaio de seleção, adaptado para frascos Erlenmeyers, foi realizado com as cepas previamente selecionadas. Foram utilizados frascos de 125 mL contendo 50 mL do meio BH, 2 ml da suspensão bacteriana padronizada em  $1,5 \times 10^8$  UFC e 1% da fonte de carbono. As amostras foram acondicionadas em shaker rotativo a 180 rpm e temperatura ambiente ( $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ) durante 17 horas (Figura 4C). Após esse período adicionou-se 1mL do indicador 2,6 DCPIP, acondicionando-as novamente no shaker sob as mesmas condições anteriores durante 24 horas (Figura 4D).

### Identificação dos microrganismos

Baseando-se nas características de crescimento dos isolados bacterianos, dez cepas foram selecionadas para a realização da identificação por meio de testes bioquímicos. Os procedimentos analíticos para identificação dos isolados bacterianos foram realizados no Laboratório de Fármacos e Ensaio Antimicrobianos pertencente ao Departamento de Antibióticos do Centro de Ciências Biológicas, situado na Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, com o apoio da professora Dra. Kêsia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena. As colônias foram primeiramente reativadas em tubos e

placas contendo caldo e ágar Mueller Hinton respectivamente. Em seguida observou-se as características de crescimento e realizou-se a coloração de Gram. Todos os microrganismos foram repicados nos meios seletivos e diferenciais (Agar eosina-azul de metileno-EMB; MacConkey) para confirmação do Gram.

Realizou-se o teste de Oxidase. As bactérias Gram-negativas foram inoculadas nos meios de identificação bioquímica (TSI, Citrato, SIM, LIA, Ureia). Para as bactérias oxidase positivo foi acrescentado o meio de OF de glicose para confirmação de bacilos Gram-negativos não fermentadores.

Para as bactérias oxidase negativo acrescentou-se os testes bioquímicos lisina, ornitina e fermentação em melibiose.

Os testes realizados para a identificação das bactérias não fermentadoras estão representados no quadro 1.

### Tratamento Estatístico

A normalidade dos dados dos microrganismos isolados com o uso das fontes de carbono e nos três diferentes períodos de enriquecimento foi verificada pelo teste estatístico de Kolmogorov e Smirnov (KS). Por meio do ANOVA one-way verificou-se a significância dos dados, tendo o teste de Bartlett indicado sua homogeneidade. Realizou-se também uma Análise dos Componentes Principais (ACP) dos casos e das variáveis verificando os agrupamentos envolvendo as estações de estudo, juntamente com os parâmetros físico-químicos e o número de microrganismos.

**Quadro 1.** Testes para identificação das Bactérias não-fermentadores.

Micro-organismo	Bile esculina	DNase	Agar cetrimida	Arginina	Lisina
Nº 1	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Nº 2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
Nº 3	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
Nº 4	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
Nº 5	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Controle Positivo	<i>Enterococcus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Controle negativo	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Klebsiella sp</i>	<i>Shigella sp.</i>

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os padrões granulométricos das regiões de estudo foram caracterizadas apenas visualmente. Na área de produção, notou-se a predominância de sedimento arenoso ao longo do *apicum*. Já no manguezal desta mesma área o sedimento apresentou-se argiloso, sendo observada a presença de espécimes de pequeno e médio porte de *Laguncularia* como vegetação de mangue.

*Laguncularia racemosa* é a espécie de mangue predominante na Baía de Todos os Santos, apresentando escassez da vegetação em

algumas localidades caracterizadas pela exposição do sedimento (PEIXOTO et al., 2011).

Na área de transporte, os manguezais amostrados apresentavam sedimento pouco argiloso, tendo sido observado um resquício de vegetação de mangue representado pelos gêneros *Laguncularia* e *Rizophora* de pequeno porte e com folhas amareladas. A proximidade de manguezais com áreas industriais do setor petrolífero provoca a diminuição da vegetação de mangue na orla da BTS. As folhas das plantas tornam-se amareladas, enrugadas e perfuradas devido à exposição ao óleo (VEIGA, 2003).

Na área de refino o sedimento do manguezal era predominantemente argiloso. Notou-se a existência de espécimes de médio e grande porte de *Rizophora*, *Avicennia* com predominância de *Laguncularia*. No norte da BTS os sedimentos são principalmente argilosos enquanto que ao sul nota-se a presença principalmente de areias médias e grossas (LEAO; DOMINGUEZ, 2000). Em derrames de petróleo os contaminantes aderem principalmente nas partículas sedimentares finas, tornando difícil a sua limpeza por processos físicos ou químicos. A biodegradação é o processo mais eficaz para a recuperação da área que foi impactada em longo prazo (ATLAS, 1981).

Em todos os pontos amostrados a localização foi realizada por meio do GPS. Os parâmetros físico-químicos temperatura, pH, Eh, condutividade e salinidade, conforme representado pela Tabela 3.

Verifica-se por meio da tabela 3 que os valores de pH nas estações amostradas apresentou-se em torno na neutralidade. Microrganismos degradantes de petróleo são mais abundantes em ambientes com pH entre 6,0 e 8,0, sendo os fungos mais resistentes às condições de pH ácido (LEAHY; COLWELL, 1990). O Eh é um parâmetro por meio do qual é possível mensurar a concentração de oxigênio, onde menores valores de Eh significam menores concentrações de oxigênio (MARIANO, 2006).

**Tabela 3.** Parâmetros-físico-químicos das coletas realizada em Belmonte (BE) no dia 27 de novembro de 2011 e nas áreas de produção (DJ1 e DJ2), transporte (MD3 e MD4) e refino (CN5 e CN6) da BTS no dia 09 de novembro de 2011 e o número de isolados por fonte de carbono (B) – bactérias, (L) – leveduras, (F) – fungos filamentosos

Ponto	Branco								
	BE	BTS	BE	DJ1	DJ2	MD3	MD4	CN5	CN6
Parâmetros									
Hora	13:27	14:40	13:27	11:30	12:10	13:00	13:25	14:00	14:30
pH	6,30	6,97	6,30	6,88	7,05	7,57	7,71	7,45	6,97
Eh	325	-19	325	-8	-21	-53	-63	-37	-19
Salinidade	0	5	0	13	10	11	20	3	5
Condutividade	0,01	8,55	0,01	3,16	4,92	3,73	3,02	4,64	8,55
<b>Isolados</b>									
B	6	9	21	30	24	27	34	35	46
L	3	5	15	19	13	22	9	5	16
F	1	1	1	2	3	1	2	1	2

A temperatura das estações de estudo não apresentou grandes oscilações, variando entre 25°C a 27°C. A atividade dos microrganismos e a taxa de degradação dos compostos orgânicos são altamente influenciadas pela temperatura, a qual pode alterar a composição de petróleo e também da comunidade microbiana. A biodegradação de poluentes por microrganismos ocorre principalmente em temperatura entre 20 e 35°C (LEAHY; COLWELL, 1990; BAPTISTA, 2003).

Foram observadas alterações no aspecto visual dos frascos Erlenmeyers ao longo dos dias. Alguns frascos apresentavam fases imiscíveis, com texturas variando de aquoso a muito cremoso e colorações diferenciadas, enquanto que outros apresentavam homogêneos e com uma única coloração em diferentes tons de marrom e pequenas partículas oleosas arredondadas (Figura 5).

Após o crescimento em 4 dias em estufa a 30°C nas placas contendo meio BH sólido notaram-se padrões de crescimento semelhantes a depender da fonte de carbono utilizada, independente da localidade.

No segundo e terceiro isolamentos, em todas as amostras, ocorreu uma maior variabilidade de colônias nas placas contendo o petróleo como única fonte de carbono (Figura 6).

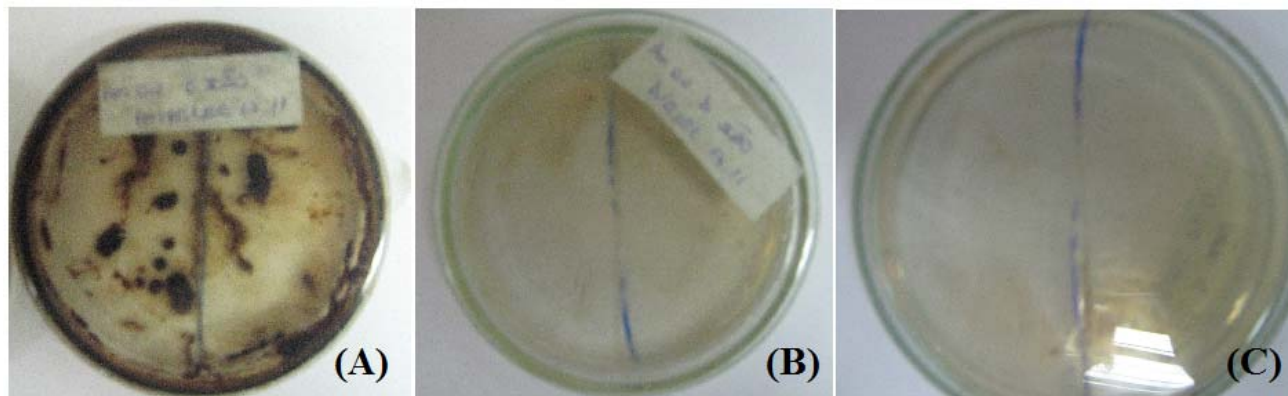
Ao final das atividades de isolamento obteve-se um total de 47 microrganismos na área

referência (JR), sendo bactérias (58%), leveduras (38%) e fungos filamentosos (4%) (Figura 7). Nas áreas pertencentes à BTS foram isolados 306 microrganismos, dentre eles bactérias (67%), leveduras (29%) fungos filamentosos (4%) (Figura 7). Grupos de bactérias isoladas de sedimentos de manguezais contaminados da Baía de Todos os Santos crescem preferencialmente quando expostos a determinados compostos do petróleo (PEIXOTO et al., 2011).

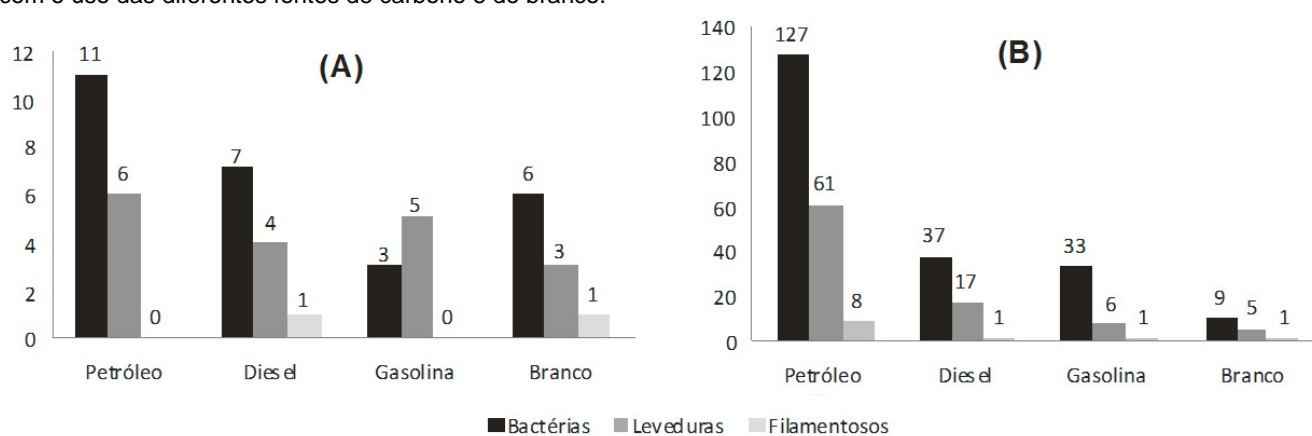
**Figura 5.** Aspecto visual dos frascos Erlenmeyers das amostras de Belmonte após 08 dias de enriquecimento.



**Figura 6.** Aspecto visual das placas de Petri com meio BH sólido após a adição de 200 µL de (A) petróleo, (B) diesel e (C) gasolina como fonte de carbono.



**Figura 7.** Tipos e totais de micro-organismos isolados de amostras do (A) Sul da Bahia, (B) da Baía de Todos os Santos com o uso das diferentes fontes de carbono e do branco.



Utilizando petróleo bruto como fonte de carbono, foram isoladas 36 cepas microbianas isoladas de 14 amostras provenientes de diferentes locais contaminados por petróleo (AFUWALE; MODI, 2012).

Na tabela 4 estão mencionados trabalhos relacionados com o isolamento de microrganismos utilizando diferentes petroderivados como fonte de carbono. Verifica-se um padrão semelhante ao apresentado no trabalho executado, obtendo-se um maior número de bactérias isoladas em relação às leveduras e aos fungos filamentosos.

Estudos relatam que o número de cepas microbianas isoladas de áreas contaminadas é

maior do que das áreas que não possuem indícios de contaminação pelo fato de estarem adaptadas a presença dos hidrocarbonetos (LEAHY; COLWELL, 1999; WILD; JONES, 1986).

Ao correlacionar o número de microrganismos isolados com o petroderivado utilizado as maiores quantificações foram obtidas com a adição do petróleo, tendo sido representado por um maior número de bactérias (65%) em relação aos demais microrganismos. Leahy e Colwell (1990) afirmam que a diversidade existente entre os elementos que compõem o petróleo bruto e seus derivados refinados influencia as taxas de degradação tanto do óleo bem como de suas frações.

**Tabela 4.** Microrganismos isolados na BTS, Belmonte, Suape, Minas Gerais, França e Egito utilizando diferentes petroderivados como fonte de carbono. B – bactérias; L – leveduras; F – fungos filamentosos

Locais	B	L	F	Fonte de C	Referências
BTS	206	89	1	Petróleo, diesel e gasolina*	
Belmonte	27	18	2	Petróleo, diesel e gasolina*	
BTS	297	nd	45	Petróleo e quitosana	SOUZA, 2006
Suape	40	23	23	Diesel, gasolina, bunker, querosene	SOUZA et al., 2005
Minas Gerais	185	4	4	Petróleo e Gasolina	BATISTA et al., 2006
França	110	nd	nd	Diesel	CHAINÉAU et al., 1999
Egito	nd	nd	28	Diesel	EL-MORSY, 2005
Total	884	134	103		

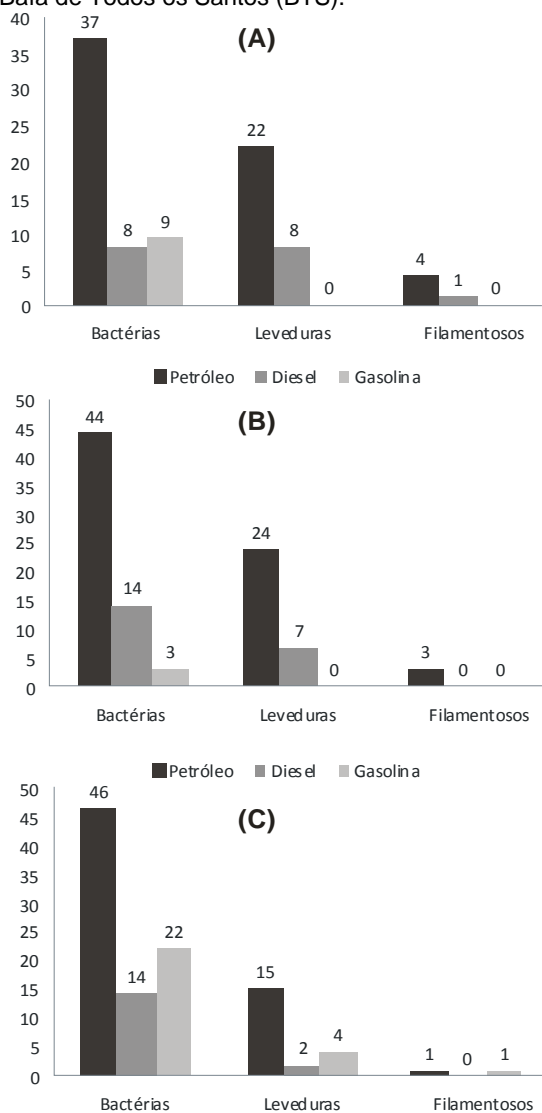
\*Dados ainda não publicados. nd – não definido



Nas amostras em que o diesel foi utilizado as bactérias corresponderam a 67% dos microrganismos isolados, as leveduras a 31% e os fungos filamentosos a 2% (1). Sob a adição da gasolina 82,5% dos microrganismos foram representados pelas bactérias, 15% pelas leveduras e 2,5% (Figura 7).

Em relação aos setores da cadeia produtiva de petróleo a área de refino (CN) foi a que apresentou o maior número de microrganismos isolados (36%) principalmente bactérias com o uso do petróleo como fonte de carbono (Figura 8C). A área de transporte obteve 33% do total de isolados (Figura 8B) e a área de produção 30% (Figura 8A).

**Figura 8.** Tipos e totais de micro-organismos isolados para diferentes fontes de carbono por área de atividade petrolífera, onde: (A) produção (Dom João), (B) transporte (Madre de Deus) e (C) refino (Candeias) na Baía de Todos os Santos (BTS).



Em um trabalho realizado por Batista et al. (2006) amostras das proximidades da Refinaria Gabriel Passos (REGAP) em Minas Gerais, da Refinaria Duque de Caxias (REDUC) no Rio de

Janeiro e da garagem de manutenção de motores de veículos da Universidade Federal de Viçosa (UFV) foram enriquecidas em meio BH durante 7 dias. Foram isoladas 185 bactérias, 3 fungos filamentosos e 4 leveduras com o uso de petróleo ou gasolina como fonte de carbono.

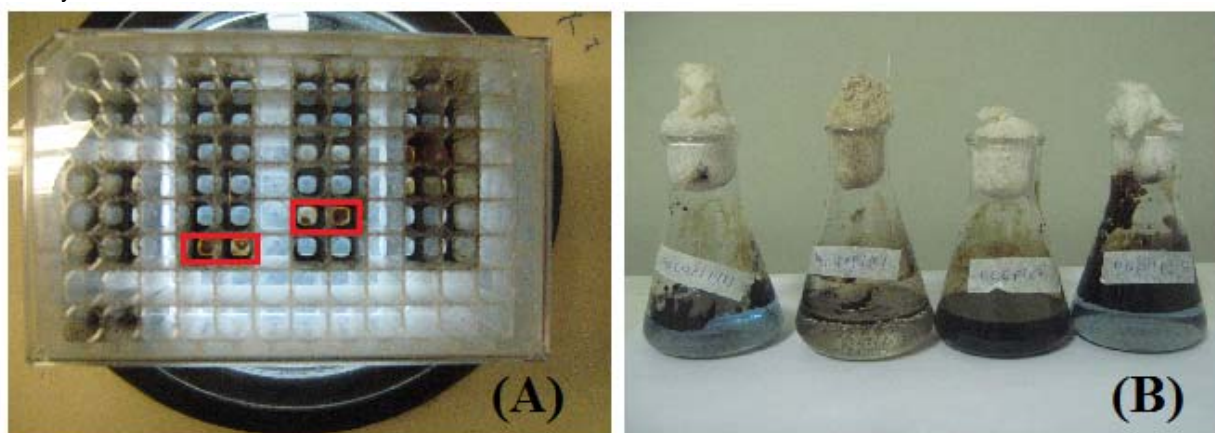
A área de transporte obteve um maior número de leveduras isoladas (38%) (Figura B). Destes 77% foram obtidos quando o petróleo foi utilizado como fonte de carbono. Não foi registrada nenhuma levedura com o uso da gasolina tanto para área de produção (Figura 8A) quanto para a de transporte (Figura 8B), existindo apenas 4 representantes na área de refino (Figura 8C). Acredita-se que do total de leveduras isoladas, as pertencentes à área de transporte estavam mais adaptadas aos componentes do petróleo disponível no meio ambiente do que das demais localidades, aumentando como consequência o número destes microrganismos isolados.

Os fungos filamentosos foram predominantes na área de produção (50%) (Figura 8A). Destes 80% foram isolados com o uso do petróleo e 20% com o diesel. Não se obteve nenhum fungo filamentoso na área de produção e de transporte com o uso da gasolina, já na área de refino apenas um único representante foi registrado. Mariano (2006) ressalva que o óleo diesel possui uma massa específica maior do que o da gasolina devido à suas cadeias maiores, menor volatilidade e solubilidade sendo considerado menos tóxico. Tal fator possibilita um crescimento maior de microrganismos no óleo diesel em relação à gasolina.

No ensaio de seleção realizado por meio das placas multipoços, das 118 cepas bacterianas crescidas em petróleo, 26 foram selecionadas como potenciais degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo em 24 horas (Figura 9A). Nos ensaios de seleção adaptados aos frascos Erlenmeyers o número de cepas selecionadas foi reduzido para 15 (Figura 9B).

Souza et al. (2005) utilizando óleo diesel, gasolina, bunker e querosene em linhagens de bactérias, fungos filamentosos e leveduras previamente isoladas, obtiveram as maiores quantificações de bactérias selecionadas após 24 horas quando o *bunker* foi utilizado como fonte de carbono enquanto que as leveduras predominaram com o uso da gasolina e os fungos filamentosos com o querosene. Em experimento realizado dos 36 microrganismos isolados com o uso de petróleo bruto como fonte de carbono, apenas duas foram capazes de descolorir o meio em 8 foram, sendo, portanto, consideradas selecionadas (AFUWALE; MODI, 2012). 23 leveduras isoladas de regiões próximas ao porto de Suape em Pernambuco, foram isoladas utilizando diesel como fonte de carbono e apenas duas foram selecionadas, devido a alteração do meio de cultivo de azul para incolor após 16 e 24 horas de incubação (MIRANDA et al., 2007).

**Figura 9.** Ensaios de seleção. (A) – Aspecto visual dos resultados obtidos nos ensaios utilizando as placas multipoços, destaque para resultados positivos; (B) – Aspecto visual dos resultados apresentados nos ensaios nos frascos Erlenmeyers.



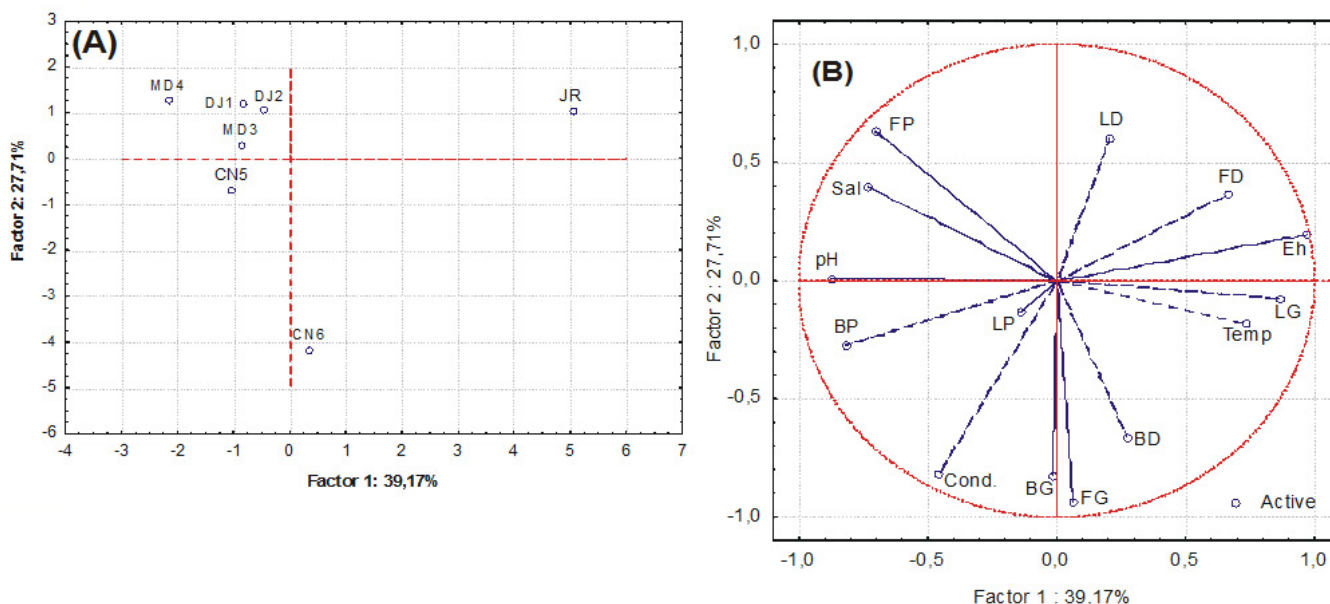
Dentre as bacterianas possíveis degradadoras de petróleo e seus derivados, as espécies identificadas pelo Laboratório de Fármacos e Ensaios Antimicrobianos da UFPE foram: *Enterobacter gergoviae*, *Citrobacter sedlakii*, *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Stenotrophomonas matophilia*. Em pesquisa realizada por Brito et al. (2006), nos manguezais muitos grupos bacterianos, tais como *Pseudomonas*, *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Microbulbifer*, *Sphingomonas*, *Micrococcus*, *Gordonia* entre outros, apresentam capacidade de degradar hidrocarbonetos e estão presentes nos sedimentos.

As análises estatísticas de KS indicaram que os dados obtidos apresentam uma distribuição

normal. Os testes one-way ANOVA informaram que os valores apresentados pelo número de bactérias, fungos filamentosos e leveduras isoladas são extremamente significativos, apresentando  $P < 0.0001$ , sendo indicada a heterogeneidade destes através dos testes de Bartlett.

Na figura 10 pode ser visualizado a ACP, o qual possui 61% de variância por meio de 2 fatores. A salinidade e o pH são os parâmetros físico-químicos que mais contribuíram com número total de isolados, principalmente com relação às bactérias, nas áreas MD04, MD03 e DJ01. Os fungos filamentosos e as leveduras receberam uma maior influência do Eh em relação à CN06, DJ01 e DJ02.

**Figura 10.** ACP demonstrando os padrões de crescimento dos microrganismos. (A) – Casos; (B) – Variáveis.



BP – Bactérias em petróleo; BD – Bactérias em diesel; BG – Bactérias em gasolina; LP – Leveduras em petróleo; LD – Leveduras em diesel; LG – Leveduras em gasolina; FP – Fungos filamentosos em petróleo; FD – Fungos filamentosos em diesel; FG – Fungos filamentosos em gasolina.

## CONCLUSÃO

Após a realização das etapas laboratoriais de isolamento dos microrganismos degradantes de petróleo e seus derivados nativos de ecossistemas costeiros ao norte da Baía de Todos os Santos, utilizando diferentes petro-derivados como fonte de carbono concluiu-se que houve:

- grande quantidade e diversidade de microrganismos isolados;

- padrões de crescimento diferenciados a depender das áreas de estudo, das fontes de carbono utilizadas e da não utilização destas;

- após 08, 15 e 21 dias de enriquecimento existiu um padrão de crescimento distinto para os microrganismos isolados a depender do período de enriquecimento, da fonte de carbono utilizada bem como para a não utilização da fonte de carbono;

- isolou-se um total de 306 microrganismos, tendo sido o branco representado por 60% de bactérias, 33 % de leveduras e 7% de fungos filamentosos. Já nas amostras em que os petro-derivados foram utilizados, 67% dos isolados foram indicados pelas bactérias, 29% pelas leveduras e 7% de fungos filamentosos, não havendo diferença significativa entre o branco e as demais amostras enriquecidas;

- obteve-se um maior número de microrganismos isolados quando o petróleo foi utilizado como única fonte de carbono (62%);

- a área de refino apresentou um maior número de microrganismos isolados seguidos das áreas de transporte e produção, sendo estes principalmente bactérias com o uso do petróleo como única fonte de carbono.

As características químicas dos contaminantes, bem como as particularidades do ambiente em que eles se encontram possibilitam inferir questões relacionadas à extensão e à velocidade da contaminação e os danos que poderão ser causados (PEREIRA et al., 2009).

## REFERÊNCIAS

- AFUWALE, C; MODI, H. A. Study of bacterial diversity of crude oil degrading bacteria isolated from crude oil contaminated sites. **Life sciences leaflets**, v. 6, p.13-23, 2012.
- ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons and environmental perspective. **Microbiol. Rev.**, n 45, v. 1, p. 180-209, 1981.
- BALBA, M. T; AL-AWADHI, N; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal of microbiological methods**, v. 32, p. 155-164, 1998.
- BAHIA. Secretaria do Planejamento, Ciência e Tecnologia. Superintendência de Estudos Econômicos e Sociais da Bahia. **Base cartográfica digital Estado da Bahia: mapeamento topográfico sistemático 1:100.000**. Salvador: SEI, s.d. CD-ROM, 3 v.
- BAPTISTA, S. J. **Seleção das melhores condições de biodegradação de petróleo em solo argiloso**. 2003. 163f. Tese (mestrado em tecnologia de processos químicos e bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.
- BASTOS, A. C. S; FREITAS, A. C. Agentes e Processos de Interferência, degradação e dano ambiental. In: CUNHA, S. B; GUERRA, A. J. T. **Avaliação e perícia ambiental**. 10.ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 2010, p. 68.
- BATISTA, S. B; MOUNTEER, A. H; AMORIM, F. R; TOTOLA, M. R. Isolation and characterization of biosurfactant/biomulsifier producing-bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource technology**, v. 97, p. 868-875, 2006.
- BRITO, E. M. S; GUYONEAUND, R; GÕNI-URRIZA, M; RANCHOU-PEYRUSE, A. VERBAERE, A, CRAPEZ, M. A. C; WASSERMAN, J. C. A; DURAN, R. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. **Research in microbiology**, v. 157, n.8, p. 752-762, 2006.
- CELINO, J. J; QUEIROZ, A. F. S. Fonte de grau de contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) de baixa massa molecular em sedimentos da Baía de Todos os Santos, Bahia. **R. Esc. Minas**, v. 59, n.3, p.265-270, 2006.
- CRAPEZ, M. C; BORGES, A. L. N; Bispo, M. G. S; PEREIRA, D. C. Tratamento para derrames de petróleo: biorremediação. **Ciência Hoje**, v. 30, n. 179, p. 33-37. 2002.
- CHAERUN, S. K; TAZAKI, Kazue; ASADA, Ryuji; KOGURE, Kazuhiro. Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon degrading bacteria. **Environment International**, v. 30, p. 911-922, 2004.
- CHAÎNEAUN, C. H; MOREL, J; DUPONT, J; BURY, E; OUDOT, J. Comparison of fuel oil biodegradation comparison of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperature agricultural soil. **Sci. Total Environ.**, v. 9, n. 227, p. 237-247, 1999.
- EL-MORSY, E. M. Evaluation of microfungi for the bioremediation of diesel oil in Egypt. **Land contamination and reclamation**, v. 13, n. 2, 147-159, 2005.

- HANSON, K. G; DESAI, G; DESAI, A. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology techniques**, v. 7, n.10, p. 745-748, 1993.
- HATJE, V; ANDRADE, J. B. **Baía de Todos os Santos: aspectos oceanográficos**. 1. ed. Salvador: EDUFBA, 2009, 306p.
- HARAYAMA, S; KISHIRA, H; KASAI, Y; SHUTSUBO, K. Petroleum biodegradation in marine environments. **J. Molec. Microbiol. Biotechnol**, v.1, n.1, p. 63-70, 1999.
- LEAO, Z. M. A. N; DOMINGUEZ, J. M, L. Tropical Coast of Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 41, n.1-6, p. 112-122, 2000.
- LEAHY, J. G; COLWELL, R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological reviews**, v. 54, n. 3, p. 305-315, 1990.
- MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e água contaminados por óleo diesel**. 2006, 162p. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro – SP. 2006.
- MIRANDA, R. C; SOUZA, C. S; GOMES, E. B; LOVAGLIO, R. B; LOPES, C. E; SOUZA, M. F. V. Q. Biodegradation of diesel oil by yeasts isolated from de vicinity of Suape Port in the State of Pernambuco-Brazil.
- PEIXOTO, R; CHAER, G. M; CARMO, F. L; ARAUJO, F. V; PAES, J. E; VOLPON, A; SANTIAGO, G. A; ROSADO, A. S. Bacterial communities reflect the spatial variation in pollutant levels in Brazilian mangrove sediments. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, p. 341-354, 2011.
- PEREIRA, N. J; GOMES, E. B de; SORIANO, A. U. **Biodegradação de hidrocarbonetos**. Rio de Janeiro, 76p. 2009.(Séries em biotecnologia, v.3).
- SANTOS, H. F; CARMO, F.L; PAES, J. E. S; ROSADO, A. S; PEIXOTO, R. S. Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. **Water, air, soil pollut.**, v. 216, p. 329-350, 2011.
- SILVA, I. R. Subsídios para a gestão ambiental para praias da costa do descobrimento, litoral Sul do estado da Bahia, Brasil. **Revista da gestão costeira integrada**, v. 8, n.2, p. 47-60, 2008.
- SOUZA, C. S; MIRANDA, R. C de; SENA, K. X. F. R de; ARAÚJO, J. M de; CHIAPPETA, A de A; SOUZA, M. de F. V. Q. Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de derivados de petróleo. In: CONGRESSO de P & D EM PETRÓLEO E GÁS, 3. 2005, Salvador. **Anais eletrônicos**. UFPE, 2005. Disponível em: <[http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/3/trabalhos/IBP0444\\_05.pdf](http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/3/trabalhos/IBP0444_05.pdf)>. Acesso em: 20 nov, 2010.
- SOUZA, M. de F. V. Q. **Biorremediação de ambientes poluídos por petróleo ou seus derivados: relatório técnico**. Salvador: REDE RECUPETRO, 2006. 19p.
- VEIGA, I. G. **Avaliação da origem dos hidrocarbonetos em sedimentos superficiais de manguezais da região norte da Baía de Todos os Santos/Ba.** 2003. 205f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica e Meio Ambiente), Universidade Estadual do Norte Fluminense, Macaé – RJ, 2003.
- YAKIMOV, M. M; DENARO, R; GENOVESE, M; CAPPELO, S; D'AURIA, G; CHERNIKOVA, T. N; TIMMIS, K. N; GOLYSHIN, P. N; GILULIANO, L. Natural microbial diversity in sediments of Milazzo Harbour (Silicy) and community successions during microcosms enrichment with various hydrocarbons. **Environmental microbiology**, v. 7, n. 9, p. 1426-1441, 2005.
- WILD, S. R; JONES, K. C. Biological and abiotic losses of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) from soils freshly amended with sewage sludge. **Environmental toxicology and Chemistry**, v. 12, n.1, p.5-12, 1993.