

# Uso de *Pseudomonas aeruginosa* para biodegradação de poluentes contaminantes de água

## *Use of Pseudomonas aeruginosa for biodegradation of water contaminant pollutants*

Ana Clara Dantas de Pinho<sup>1</sup>, Marla Ribeiro Arima Miranda<sup>1</sup>, Karla de Toledo Candido Muller<sup>1</sup>, Ricardo Martins dos Santos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil

\*Autor correspondente. E-mail: rimasan@gmail.com

Recebido: 29/10/2017; Aceito: 10/05/2018

### RESUMO

A Biorremediação é um processo seguro e eficiente, quando comparada aos processos físicos e químicos convencionais utilizados no tratamento de locais contaminados. O benefício desses processos é a mineralização do poluente, isto é, a transformação deste em gás carbônico, água e biomassa. O óleo de cozinha, o benzeno e a gasolina, quando presentes no ambiente, ocasionam grande impacto ecológico, além de infringirem a legislação ambiental quando são encontrados em quantidade superior à permitida. É com esse intuito que foi analisada a eficácia da utilização de microrganismos da espécie *Pseudomonas aeruginosa*, na biodegradação de poluentes na água potável e não potável (lagoa). De acordo com os resultados obtidos foi possível observar que o melhor crescimento foi verificado na gasolina comercial. Aos 60 dias do início do experimento foi possível observar o não isolamento da *Pseudomonas aeruginosa* na água não potável.

**Palavras-chave:** Biorremediação. Poluentes. Microrganismos. *Pseudomonas aeruginosa*.

### ABSTRACT

Bioremediation is a safe and efficient process, when compared to the conventional physical and chemical processes used in the treatment of contaminated sites. The benefit of these processes is the mineralization of the pollutant, that is, the transformation into carbonic gas, water and biomass. Cooking oil, benzene and gasoline, when in the environment, cause great ecological impact, in addition to violating environmental legislation, when they are found in a quantity greater than allowed. It is for this purpose that the effectiveness of the use of microorganisms of the species *Pseudomonas aeruginosa* in the biodegradation of pollutants in drinking and non-potable water (lagoon) was analyzed. According to the results obtained, it was possible to observe that the best growth was observed in commercial gasoline. At 60 days after the start of the experiment it was possible to observe the non-isolation of *Pseudomonas aeruginosa* in non-potable water.

**Keywords:** Bioremediation. Pollutants. Microorganisms. *Pseudomonas aeruginosa*.

### INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os problemas ambientais têm se tornado cada vez mais frequentes devido ao aumento da atividade industrial. Com estes ingredientes, os problemas advindos da ação antrópica têm atingido dimensões catastróficas, e sem o devido controle ou conhecimento do descarte de poluentes podem ser observadas alterações na qualidade do solo, do ar e da água (FREIRE et al. 2000). O objetivo da biorremediação é mineralizar os poluentes, liberando apenas substâncias inertes, como dióxido de carbono e a água. A biorremediação baseia-se em três aspectos principais: a existência de microrganismos com capacidade catabólica para degradar o contaminante; a disponibilidade do contaminante ao ataque microbiano ou enzimático; e condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade do agente biorremediador (PEREIRA & LEMOS, 2005).

Muitos microrganismos também têm sido utilizados para a degradação de gasolina, óleo diesel e resíduo de petróleo proveniente de derramamentos nos oceanos ou no solo. Dentre os hidrocarbonetos que compõem estes resíduos, os mais tóxicos e que causam maior preocupação são os chamados BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno

e os três isômeros de posição do xileno). Estes compostos são utilizados como fonte de carbono por diversas espécies de bactérias, leveduras e fungos (TEIXEIRA, 2007).

Entre outros resíduos está o óleo. Este é o que mais polui o meio ambiente, devido ao seu difícil descarte. Muitas vezes o descarte segue o caminho dos mananciais aquáticos ou até mesmo o solo (AZEVEDO, 2009). O óleo de cozinha descartado diretamente na pia pode prejudicar o meio ambiente. Se o produto for para as redes de esgoto encarece o tratamento dos resíduos em até 45%, e o que permanece nos rios provoca a impermeabilização dos leitos e terrenos, o que contribui para que ocorram as enchentes. A solução para este problema é a reciclagem do óleo vegetal. E existem várias maneiras de reaproveitar esse produto sem resultar em prejuízos ao meio ambiente (LOPES & BALDIN, 2009).

O gênero *Pseudomonas* é o mais abundante e o mais significativo grupo de bactérias do nosso planeta em termos ecológicos, com os seus membros a serem encontrados em grande número na maioria dos principais ecossistemas naturais, terrestres e aquáticos e, também, em íntima associação com algumas plantas e animais (SPIERS et al. 2000). Recentemente, sugeriu-se ainda que a espécie *P. aeruginosa* é, entre todas as espécies deste gênero, aquela com maior representação quantitativa no nosso planeta. Sob condições ambientais específicas, esta bactéria produz um biossurfactante contendo ramnose – glicolípido. O tipo e a proporção do ramnolípido produzido dependem da cepa, da fonte de carbono utilizada e das condições de cultivo (FONTES et al. 2008).

Ramnolípideos são surfactantes de origem microbiana pertencentes à classe dos glicolípideos. *Pseudomonas aeruginosa* produz até seis tipos de ramnolípideos, que possuem estrutura química e atividade superficial similares, podendo reduzir a tensão superficial da água de 72 mN m<sup>-1</sup> para 30 mN m<sup>-1</sup> com uma concentração micelar crítica de 27 a 54 mg L<sup>-1</sup> (WEI et al. 2005). *P. aeruginosa* é uma linhagem bem estudada e produtora, principalmente, de monoramnolípideos do tipo Rha-C10-C10 e diramnolípideos do tipo Rha2-C10-C10 (SYLDATK et al. 1985). Estes biossurfactantes apresentam crescente interesse por parte da comunidade científica devido às suas propriedades físico-químicas e tensoativas que lhes conferem um amplo espectro de aplicação, incluindo áreas como a biorremediação, recuperação terciária do petróleo, aditivos em alimentos, fármacos (antimicrobóticos e antibióticos) e tintas, produtos de limpeza e cosméticos (HENKEL et al. 2012).

Embora existam diversas tecnologias que utilizam processos físicos e/ou químicos para a descontaminação de ambientes poluídos, o processo biológico de biorremediação é uma alternativa ecologicamente mais adequada e eficaz para o tratamento de ambientes contaminados com moléculas orgânicas de difícil degradação e metais tóxicos (GAYLARD et al. 2005).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo explorar a capacidade metabólica da *Pseudomonas aeruginosa* em crescer em ambientes poluídos com gasolina, óleo e benzeno, e isolar a *Pseudomonas aeruginosa* em água potável e não potável, observando o potencial de crescimento em cada meio.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Coleta das amostras de água e mensuração do pH*

Para a realização do experimento foram coletadas amostras de 15mL de água de lagoa da Fazenda Escola da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), localizada em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul, e 15 mL de água potável de torneira. A água da torneira vem do sistema de tratamento e abastecimento municipal (águas Guariroba), e segue a legislação vigente de potabilidade.

Com o aparelho pHmetro Digimed DM-22, foram feitas mensurações do pH de cada substância poluente, e das águas de torneira e da lagoa.

### *Preparo da cepa de Pseudomonas aeruginosa*

Utilizou-se uma cepa da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* NEWP 0053 da marca NewProv. Esta cepa foi ativada em meio de cultura líquido Mueller Hinton, e foram feitos repiques (por 24 horas em temperatura de 37°C) até o momento da análise. A *P. aeruginosa* foi quantificada pela escala Nefelométrica de Mc Farland, e ajustada à concentração de 15x10<sup>8</sup> UFC/mL.

### *Preparo do PCA (Plate Count Agar)*

Foi utilizado o Agar PCA ISSO 4833, lote 121512204, pesado a 5,875g e suspenso em água destilada em 250 mL. O meio foi autoclavado em 121°C por 15 minutos. O equipamento utilizado para autoclavar foi a

autoclave vertical BIO ENG modelo A18. Após o procedimento de esterilização, o meio foi distribuído em placas de Petri e reservadas em geladeira.

### Contaminantes da água

Os contaminantes utilizados foram gasolina comercial, adquirido em posto de abastecimento; benzeno, fornecido pela universidade da marca Vetec, lote 950748; e óleo reutilizado de cozinha de casa comum.

### Parâmetros

Segundo a resolução do CONAMA n° 430 de 13 de maio de 2011 que dispõe sobre as condições e padrões de lançamentos de efluentes no meio ambiente, preconiza que o valor máximo permitido para condições de lançamento no efluente de óleo vegetal é até 50mg/L, benzeno até 1,2mg/L. Para a gasolina, não foi encontrado um dado específico, sendo composta pelo conhecido BTEX, que são benzeno, tolueno e xilenos os valores máximos permitidos na legislação para esses componentes em 1,0 a 1,6mg/L aproximadamente (BRASIL, 2014).

### Preparo da amostra de água contaminada e inoculação para controle com *Pseudomonas aeruginosa*

O preparo da amostra de água potável foi semelhante ao da amostra de água da lagoa.

Para a amostra de água da lagoa foram separados três tubos de ensaio com tampa rosca, e em cada tubo foi colocado 5 mL de água. Em seguida foi acrescentados 5µL de gasolina em um primeiro tubo, 5µL de óleo em um segundo tubo e 5µL de benzeno em um terceiro tubo. Logo após foi adicionado em cada tubo, 100µL da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e homogeneizado, perfazendo uma concentração de  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL em cada amostra contaminada.

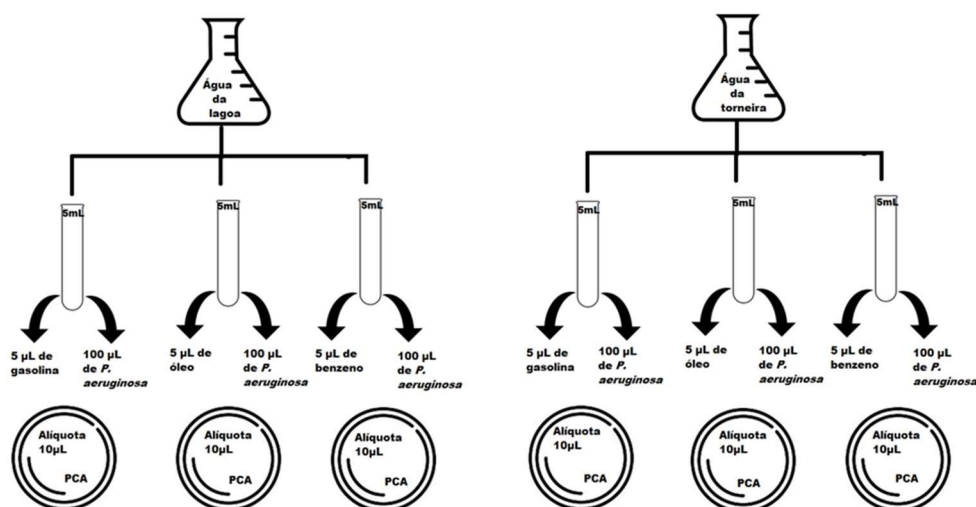
### Semeadura

Foi retirada uma alíquota de 10µL de cada tubo e transferida para placa de Petri com o Agar PCA, semeando de acordo com a técnica de Spread-plate como demonstrado na Figura 1.

A amostra de água contaminada foi semeada em diferentes tempos, como: tempo 0 (zero), tempo 2 horas, tempo 48 horas, e tempo 96 horas. A cada semeadura foi realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em software de análise de imagem de colônia LabImage CC platform após 48 horas de cultivo em estufa FANEM modelo 502A, com temperatura controlada de 37°C.

### Análise dos resultados

A imagem da placa de Petri foi capturada no aparelho Colony Doc-it imaging station scan UVP, e as UFCs foram contadas no software de análise de imagem de colônia LabImage CC platform.



**Figura 1.** Fluxograma dos procedimentos feitos. Foram adicionados 5mL de água em cada tubo de ensaio, em seguida uma alíquota de 5µL do poluente e 100µL da *Pseudomonas aeruginosa*, após duas horas foi feita a primeira semeadura. O mesmo procedimento foi feito em 48h e 96h. (Fonte própria).

Os valores obtidos das contagens de colônias (totais de bactérias x.  $10^4$  bactérias/cm<sup>2</sup>) das placas analisadas foram transformados conforme a função  $y = \log(x + 2)$ . A análise da variância foi realizada conforme modelo de blocos casualizados em parcelas subdivididas. A comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Mensuração do pH

Após a calibragem do aparelho, imergiu-se o eletrodo na amostra de água de torneira, que obteve o pH de 6,4, e na amostra de água da lagoa obteve-se o pH de 6,8. O resultado das amostras de óleo, benzeno e gasolina está representado na tabela 1.

O pH é padrão de potabilidade, devendo as águas para abastecimento público apresentarem valores entre 6,0 e 9,5, de acordo com a Portaria 518 do Ministério da Saúde e Portaria 2914. (BRASIL, 2004 e 2011).

**Tabela 1.** Apresentação de relação dos resultados obtidos através do pHmetro.

Amostra	pH água de torneira	pH água da lagoa
Benzeno	8,3	6,1
Óleo	6,0	5,7
Gasolina	7,3	6,3

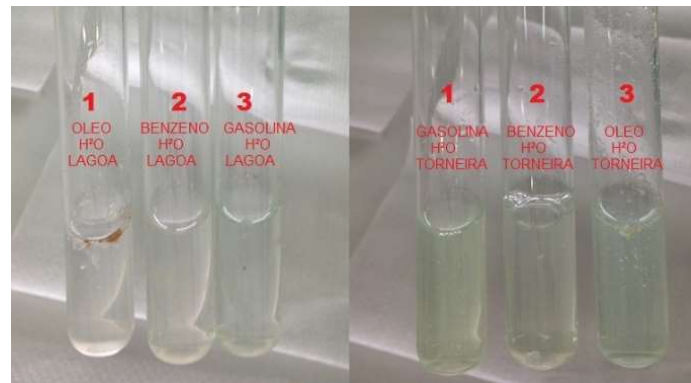
### Turbidez das amostras

Durante o experimento foi possível observar uma alteração na turbidez em todas as amostras. Após 48 horas foi observada a formação de um sobrenadante na amostra de água da lagoa com o óleo de cozinha, e na amostra com benzeno e gasolina não houve mudança na turbidez significativa. Já na amostra de água de torneira houve uma pequena mudança na turbidez nas amostras com gasolina e benzeno, a turbidez demonstrou uma coloração verde claro. Após 96 horas foi possível observar que na água da lagoa com o óleo, o sobrenadante que havia se formado anteriormente foi alterando e sua turbidez, tornou-se na cor marrom e estava mais espesso, nas outras amostras com gasolina e benzeno a cor se manteve a mesma. Na água de torneira todas as amostras ficaram esverdeadas, inclusive a amostra com o óleo, demonstrando assim que a *P. aeruginosa* estava se multiplicando.

Após 144 horas foi possível observar que as amostras de água da lagoa com o óleo houve uma mudança na coloração da água para marrom, mesma cor do sobrenadante, e estava mais turva, nas amostras de gasolina e benzeno não ocorreu nenhuma mudança significativa. Na água de torneira a turbidez das amostras permaneceram esverdeadas, em tons diferentes, sendo na gasolina a cor mais escura. As Figuras 2, 3 e 4 demonstram essas mudanças.



**Figura 2.** Ilustração da reação após 48 horas, formação de um sobrenadante na amostra de água da lagoa com o óleo de cozinha, e na turbidez em amostras com benzeno e gasolina. Mudança na turbidez com uma coloração verde claro nas amostras com gasolina e benzeno.

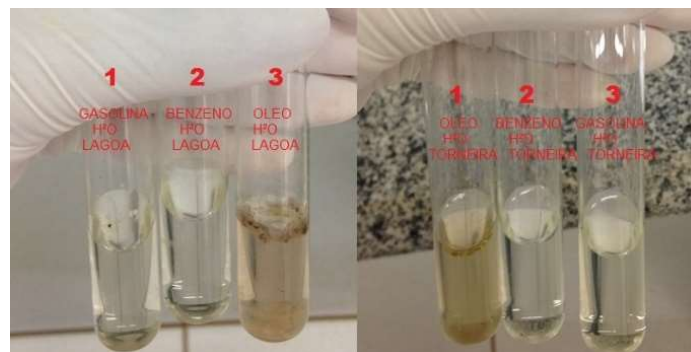


**Figura 3.** Ilustração da reação após 96 horas, o sobrenadante que havia se formado anteriormente foi alterado e sua turbidez, tornou-se na cor marrom e estava mais espesso, nas outras amostras com gasolina e benzeno a cor se manteve a mesma.

Após passados dois meses do início dos testes foi registrado uma mudança significativa na turbidez de todas as amostras. Na água da lagoa com óleo de cozinha, houve a formação de um sobrenadante espesso, e a sua cor estava marrom, as outras amostras com gasolina e benzeno estavam com uma coloração normal. Já na água de torneira foi possível observar que as amostras com benzeno e gasolina voltaram à cor normal, sem a cor esverdeada, comprovando que a *Pseudomonas aeruginosa*, depois de consumir todo o oxigênio ali presente, morreu. E na água de torneira com óleo houve uma mudança drástica comparando com a última amostra observada, e sua coloração estava marrom-esverdeada. As alterações estão demonstradas na Figura 5.



**Figura 4.** Ilustração da reação após 144 horas, as amostras de água da lagoa com o óleo houve uma alteração na turbidez da água para marrom, mesma cor do sobrenadante, e estava mais turva. Na água de torneira a turbidez das amostras permaneceram esverdeadas, em tons diferentes, sendo na gasolina a cor mais escura.



**Figura 5.** Ilustração da formação de um sobrenadante espesso de cor marrom na água da lagoa com óleo de cozinha e coloração normal nas amostras com gasolina e benzeno após dois meses do início dos testes. Retorno a coloração normal em amostras de água de torneira com benzeno e gasolina, apontando a morte de *P. aeruginosa* após consumo do oxigênio. Presença de coloração marrom-esverdeada na água de torneira com óleo.

Análise das placas

A *P. aeruginosa* utilizando benzeno como fonte de carbono em água potável, obteve um crescimento ultrapassando a quantidade de  $10^7$  Unidades Formadora de Colônia (UFC), indicando o controle ambiental do poluente. Já na água não potável (lagoa), houve queda na quantidade de bactérias para  $10^4$  UFC. Com isso foi constatada a morte de *P. aeruginosa*, indicando o não controle ambiental do poluente (Figura 6).

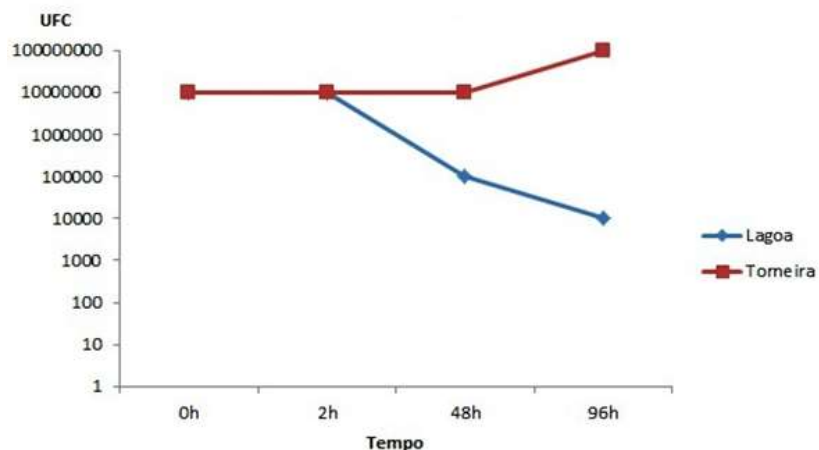


Figura 6. Gráfico representando o crescimento de *P. aeruginosa* na água contaminada com benzeno.

A bactéria *P. aeruginosa* cultivada na presença de benzeno mostrou-se capaz de utilizar este composto como fonte de carbono. Logo, ela expressa as enzimas necessárias para a sua metabolização. Deste modo, essas enzimas apresentam um potencial que pode ser explorado para o possível desenvolvimento de biorremediadores (FONSECA & TEIXEIRA, 2011).

A bactéria, utilizando compostos da gasolina comercial como fonte de carbono ocorreu também um crescimento em água potável com a quantidade de  $10^{11}$  UFC. Trata-se de um aumento bastante significativo, sendo que na amostra de água não potável (lagoa) ocorreu uma queda nas duas primeiras horas, e depois se mantendo constante (Figura 7).

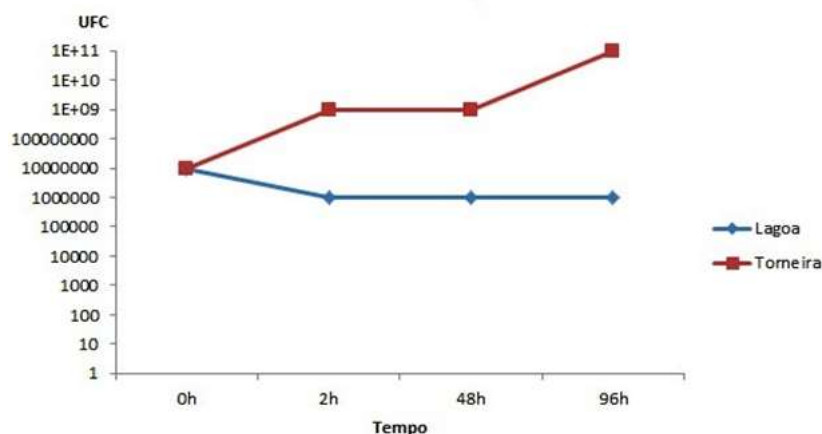
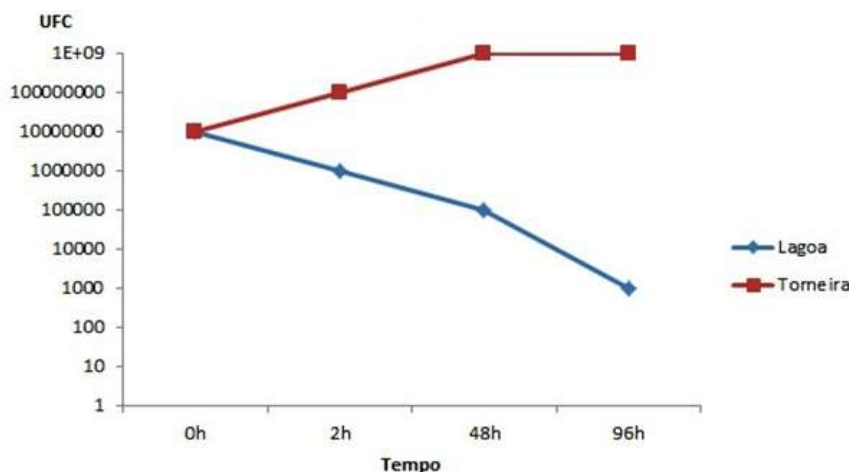


Figura 7. Gráfico representando o crescimento de *P. aeruginosa* na água contaminada com gasolina.



**Figura 8.** Gráfico representando o crescimento de *P. aeruginosa* na água contaminada com óleo reutilizado de cozinha.

Segundo Arinbasarov *et al.* (1997), cerca de 20 espécies de micro-organismos foram isolados e são capazes de degradar os componentes do petróleo, sendo que mais de 70% pertencem ao gênero *Pseudomonas*.

A biodegradação do petróleo em ambientes naturais ou em laboratório, não pode ser realizada por uma única espécie microbiana, uma vez que este poluente é constituído por vários tipos de hidrocarbonetos e nenhum microrganismo é capaz de degradar sozinho todos os compostos ali presentes. A complexidade dos processos metabólicos necessários a essa degradação leva a formação de consórcios, com microrganismos de diferentes gêneros e espécies, cada um especializado em degradar uma ou várias frações do óleo. (CRAPEZ *et al.* 2002)

Pode-se observar o crescimento da *P. aeruginosa* em água potável, na presença de óleo reutilizado de cozinha, observou-se  $10^7$  a  $10^9$  UFC, já em água não potável (lagoa) ocorreu uma queda muito grande na quantidade de bactéria, que foi de  $10^7$  para  $10^3$  UFC. Com isso, foi possível observar que em água não potável a bactéria não conseguiu se reproduzir devido a concorrência de outros componentes presentes na água da lagoa, como plânctons, outras espécies de bactérias, fungos, leveduras, entre outros. (Figura 8).

Ensaio contendo o Controle, o Biodiesel puro, o óleo vegetal novo e o óleo vegetal usado obtiveram uma melhor biodegradabilidade com a adição do Inóculo de *Bacillus subtilis*. O estudo também permitiu verificar que, de fato, a biorremediação é um mecanismo válido para tratar ambientes afetados negativamente por poluentes (FILHO, 2011).

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que houve o controle dos poluentes na água potável quando a *P. aeruginosa* foi inoculada, e observamos o não controle dos poluentes quando realizamos o teste com a mesma bactéria na água natural da lagoa mostrando a eficácia em água potável.

## REFERÊNCIAS

ARINBASAROV, M.U.; KARPOV, A.V.; SELEZNEV, S.G.; GRISHCHENKOV, V.G. AND BORONIN, A.M. Approaches to creation of bacterial consortium for efficient bioremediation of oil-contaminated soil. In: Fourth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. **Bioremediation**, v. 4, April 28-May 1, New Orleans, Louisiana, p. 523-528, 1997.

AZEVEDO, O. A. de; RABBI, M. A.; NETO, D. M. C.; HARTUIQ, M. H. Fabricação de sabão a partir do óleo combustível residual: Conscientização e educação científica. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE ENSINO DE FÍSICA, 17., 2009, Vitória. **Anais....** Vitória: SNEF, 2009.

BRASIL CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução 430 de 13 de maio de 2011**. Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes complementam e alteram a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente- CONAMA. Brasília, DF, 16 maio 2011. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em 16 de nov. de 2016

CRAPEZ, M.A.C.; Borges, A. L. N. Bispo, M G. S.; Pereira, D. C. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, v. 30, n. 179, p. 32-33, 2002.

COSTA FILHO, G. F. D. **Biodegradação de óleos derivados do petróleo e de origem vegetal estimulada por biossurfactantes em meio aquoso e monitoramento de sua toxicidade**. Trabalho de conclusão de curso (Ecologia) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2011. 68 f. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/118752>>. Acesso em: 18 de novembro de 2016.

FONSECA, R. D. V.; TEIXEIRA, K. N. Estudo da atividade catalítica de enzimas de *Pseudomonas aeruginosa* pertencentes à via de degradação do benzeno. **Perquirere (UNIPAM)**, v. 1, p. 58-69, 2011.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.

FREIRE, R. S.; PELEGRINI, R.; KUBOTA, L.T.; DURÁN, N.; ZAMORA, P.P. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 504-511, 2000.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicas de biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 34, p. 3643, 2005.

HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochem.**, v. 47, p. 1207-1219, 2012.

LOPES, R. C.; BALDIN, N. Educação ambiental para a reutilização do óleo de cozinha na produção de sabão – projeto “Ecolimpo”. In: **Anais do IX Congresso Nacional de Educação (EDUCERE) – III Encontro Sul Brasileiro de Psicopedagogia**. Paraná: PUC, 2009.

PEREIRA, L. T. C.; LEMOS, J. L. S. Degradação de hidrocarbonetos de petróleo por *Aspergillus Niger* e *Penicillium Corylophilum*. **Série Anais da XII JIC**. Centro de Tecnologia Mineral CETEM. 2004.

SPIERS, A. J.; BUCKLING, A.; RAINEY, P. B. The causes of *Pseudomonas* diversity. **Microbiology**, v. 146, p. 2345-2350, 2000.

SYLDATK, C.; LANG, S.; MATULOVIC, U.; WAGNER, F. Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 40, p. 61-67, 1985.

TEIXEIRA, A. S. **Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras de gasolina comercial**. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade federal do Rio Grande do Sul, 2007, 95 f.



WEI Y-H, CHOU C-L, CHANG J-S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, n. 2, p. 146-154, 2005.