

5º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS



TÍTULO DO TRABALHO:

Avaliação do potencial biodegradador de *Yarrowia lipolytica*

AUTORES:

Tatiana Felix Ferreira, Maria Alice Zarur Coelho e Maria Helena Miguez da Rocha-Leão

INSTITUIÇÃO:

Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Este Trabalho foi preparado para apresentação no 5º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás- 5º PDPETRO, realizado pela Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás-ABPG, no período de 15 a 22 de outubro de 2009, em Fortaleza-CE. Esse Trabalho foi selecionado pelo Comitê Científico do evento para apresentação, seguindo as informações contidas no documento submetido pelo(s) autor(es). O conteúdo do Trabalho, como apresentado, não foi revisado pela ABPG. Os organizadores não irão traduzir ou corrigir os textos recebidos. O material conforme, apresentado, não necessariamente reflete as opiniões da Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás. O(s) autor(es) tem conhecimento e aprovação de que este Trabalho seja publicado nos Anais do 5ºPDPETRO.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIODEGRADADOR DE *Yarrowia lipolytica*

Abstract

Yarrowia lipolytica is an unique strictly aerobic yeast with the ability to degrade very efficiently hydrophobic substrates. In the present work, the degrading potential of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, isolated from tropical estuarine water in Rio de Janeiro (Brazil), is evaluated. This strain was cultivated in water from the ocean containing 2%v/v Marlin petroleum incubated at 28°C and 250 rpm for 120 hours. Analysis of gas chromatography acoplated to mass spectrometry was performed to investigate the groups of compounds present in the crude oil that can be assimilated by this strain. The results showed that *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 is a microorganism with potential application at bioremediation process, being capable to consume n-alkanes (C₁₁-C₁₉), isoprenoids (pristane e phitane), diaromatic hydrocarbons (naphthalene, methylnaphthalene, dimethylnaphthalene and trimethylnaphthalene) and triaromatic hydrocarbons (phenanthrene, methylphenanthrene e dimethylphenanthrene)

Introdução

No Brasil, a produção de petróleo na Bacia de Campos, região norte do estado do Rio de Janeiro, é estratégica, representando mais de 84% da extração nacional. Uma de suas características é ser executada totalmente em *offshore*, através de 37 sistemas de produção distribuídos entre plataformas fixas, flutuantes e navios adaptados. O escoamento da produção da Bacia de Campos, 1,5 milhões de barris/dia, é realizado por oleodutos (20%) e o restante por navios (PETROBRAS). Essas atividades expõem a região a um risco potencial de acidentes, com vazamentos de óleo, possibilitando a contaminação de ambientes costeiros como praias e manguezais.

Esse tipo de catástrofe, além do dano ao meio ambiente, pode vir a causar graves impactos na imagem das companhias produtoras de petróleo. Acresce a tudo isto que as técnicas de tratamento podem ser difíceis ou inviáveis economicamente. Um método econômico é a biorremediação *in situ*, o que requer o estudo de novas espécies microbianas para este fim. A biorremediação é um processo de tratamento que utiliza microrganismos que degradam e transformam compostos orgânicos, usando hidrocarbonetos como fonte de energia e fonte de carbono em solos, lodos, águas subterrâneas, efluentes de processo e águas superficiais contaminadas com produtos como óleo cru, hidrocarbonetos de petróleo, pesticidas e solventes industriais. Numerosos microrganismos, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras, são conhecidos pela sua capacidade de degradar hidrocarbonetos. Esses microrganismos são capazes de degradar os vários tipos de hidrocarbonetos – cadeia curta, longa e numerosos compostos aromáticos, incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) (RON e ROSENBERG, 2002).

Dada sua capacidade de utilizar alcanos, ácidos graxos, glicerol e óleo, cepas de *Yarrowia lipolytica* têm sido foco de estudos independentes sendo utilizadas como agente promissor para o tratamento de contaminação com óleos mineral e vegetal (FELICE *et al.*, 2004). *Yarrowia lipolytica* é um microrganismo estritamente aeróbio, eucariótico, do reino Fungi, pertencente à classe dos Ascomycetos, subclasse Hemiascomycetos, anteriormente conhecida como *Candida lipolytica*. A levedura *Y. lipolytica* é geralmente isolada de ambientes contaminados por compostos oleosos e é adaptada a substratos hidrofóbicos. Em resposta a esta problemática, avaliou-se o potencial

biodegradador da cepa *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, isolada da Baía de Guanabara a fim de empregá-la em processos de biorremediação.

Metodologia

Materiais

Os componentes dos meios de cultivo utilizados foram: peptona e extrato de levedo (*Oxoid* - Hampshire, UK), glicose (*Reagen* – RJ, Brasil) e agar-agar (*Vetec* – RJ, Brasil).

O óleo cru utilizado foi gentilmente cedido pela Petróleo Brasileiro S.A. (PETROBRAS), tendo como principais características: Petróleo Marlin: 18,93 °API; peso molecular $\approx$ 5000; asfaltenos = 3,1%; relação resinas / asfaltenos = 8,1; relação saturados / aromáticos = 1,6; 2,66% de N, S e O.

A água do mar utilizada foi gentilmente cedida pela empresa Subsea 7 do Brasil, sendo obtida de alto mar no Campo de Camarupim, bacia do Espírito Santo – RJ, Brasil.

O solvente utilizado na extração do óleo cru foi clorofórmio (*Vetec* – RJ, Brasil).

Microrganismo

A levedura empregada no presente trabalho é uma cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* 583 IMUFRJ 50682 selecionada de um estuário da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, Brasil (HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1981) e identificada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Metodologia Experimental

Condições de cultivo

As células foram estocadas em meio semi-sólido a 4°C. Para proliferação celular, células do meio estoque foram inoculadas em frascos de 500 mL contendo 100 mL de meio líquido YPD (1% de extrato de levedo, 2% de peptona, 2% de glicose) e incubadas em shaker a 28°C e 160 rpm. Após 48 horas, as células foram centrifugadas e suspensas no meio de cultivo.

Metodologia experimental

O experimento foi realizado em 50 mL de meio de cultivo (água do mar) contendo 2%v/v de óleo cru em shaker a 28°C e 250 rpm. A concentração inicial de células foi $1,0 \pm 0,1$ mg/mL. Esse experimento foi realizado por 120 horas com amostragem diária para medida de crescimento celular. O óleo cru remanescente foi analisado ao final das 120 horas. Em paralelo foi realizado o controle abiótico, ou seja, todas as condições descritas anteriormente, porém sem a presença do microrganismo. Inclusive também foram retiradas amostras diárias para a suposta medida de crescimento celular, somente para simular a perda de óleo cru durante a amostragem.

Métodos analíticos

Quantificação celular

A concentração celular foi medida através de densidade óptica a 570 nm e esses valores foram convertidos para mg de peso seco de células/mL utilizando-se o fator de conversão obtido pela curva de peso seco.

Quantificação de óleo cru

A concentração de óleo cru ao final dos experimentos foi quantificada através de medidas de absorvância em espectrofotômetro *HACH DR/4000* a 240 nm e esses valores foram convertidos para %v/v utilizando-se a curva padrão. Esse método de quantificação foi utilizado porque o espectro de absorção na região do UV-VIS mostrou que o Marlin apresenta uma forte absorção por volta de 240 nm. Contudo, é importante ressaltar que este método não é uma maneira correta de quantificar o óleo total, pois somente alguns aromáticos absorvem a 240 nm. Essa medida apenas nos dá uma noção aproximada do nível de remoção.

Para analisar o óleo remanescente ao final dos experimentos, todo o volume do erlenmeyer (50 mL) era transferido para um funil de separação, no qual se adicionava 25 mL de clorofórmio para a extração da fase orgânica (petróleo). Em seguida, diluía-se a amostra e realizava-se a leitura em espectrofotômetro a 240 nm.

Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

As análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) foram realizadas no Laboratório LADETEC (Instituto de Química da UFRJ) utilizando-se o instrumento *Hewlett-Packard 6890N* acoplado a um detector seletivo de massas *Agilent 5973*, com coluna capilar de sílica fundida recoberta com DB-5 (5% fenil e 95% metilpolisiloxano; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

As condições cromatográficas utilizadas nas análises foram: temperatura 60°C, de 60°C a 320°C, 6°C/min e mantido em isoterma a 320°C por 20 minutos. A introdução da amostra foi realizada através de injeção automática de 1 µL da amostra sem divisão de fluxo (*splitless*). Utilizou-se ionização por impacto de elétrons a 70 eV, utilizando hélio como gás carreador a uma pressão constante de 10 psi e a uma temperatura do injetor de 290°C. As amostras foram analisadas através do modo varredura linear (*Full-Scan*), utilizando-se uma faixa de detecção de 40 a 600 m/z.

Resultados e Discussão

Na Figura 1 podemos observar o perfil de crescimento celular de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682. A concentração celular na fase aquosa do meio de cultivo apresentou oscilação durante o experimento. Isso se deve ao fato das células terem migrado para fase orgânica (petróleo). Sendo assim, ocorre uma subestimação do crescimento celular.

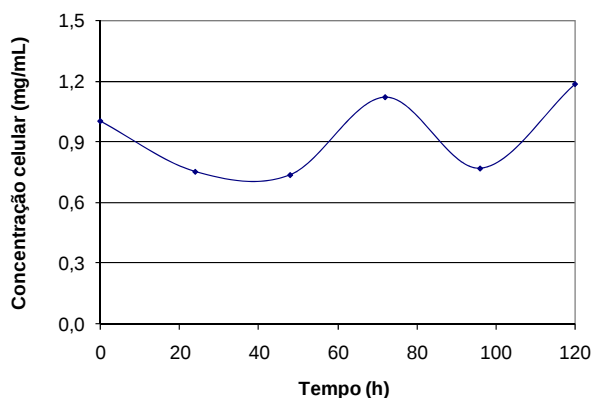


Figura 1. Perfil de crescimento de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em água do mar contendo 2%v/v de petróleo.

Essa afinidade pela fase orgânica ocorre devido ao elevado caráter hidrofóbico da superfície celular dessa cepa já reportada em trabalhos anteriores (AMARAL, 2007). *Yarrowia lipolytica* é uma espécie adaptada a substratos hidrofóbicos e a assimilação desses substratos pode ocorrer através de adsorção direta das gotas hidrofóbicas à superfície celular ou pode ser mediada por um surfactante.

As porcentagens de remoção de óleo cru no experimento de biodegradação e no controle abiótico são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Porcentagem de remoção de óleo cru analisado por espectrofotometria.

	% Remoção
Experimento de biorremediação	85
Controle abiótico	40

Considerando que a perda por evaporação e amostragem (controle abiótico) foi de 40% do óleo cru total nas 120 horas de experimento, cerca de 45% do petróleo foi metabolizado pelos microrganismos. As amostras de óleo cru remanescente do experimento de biodegradação e do controle abiótico foram submetidas a análises de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-MS) a fim de verificar o grau de biodegradação, ou seja, quais grupos de hidrocarbonetos *Yarrowia lipolytica* é capaz de consumir. A Figura 2 apresenta o cromatograma dos íons totais do óleo cru remanescente no ensaio de biodegradação e no controle abiótico.

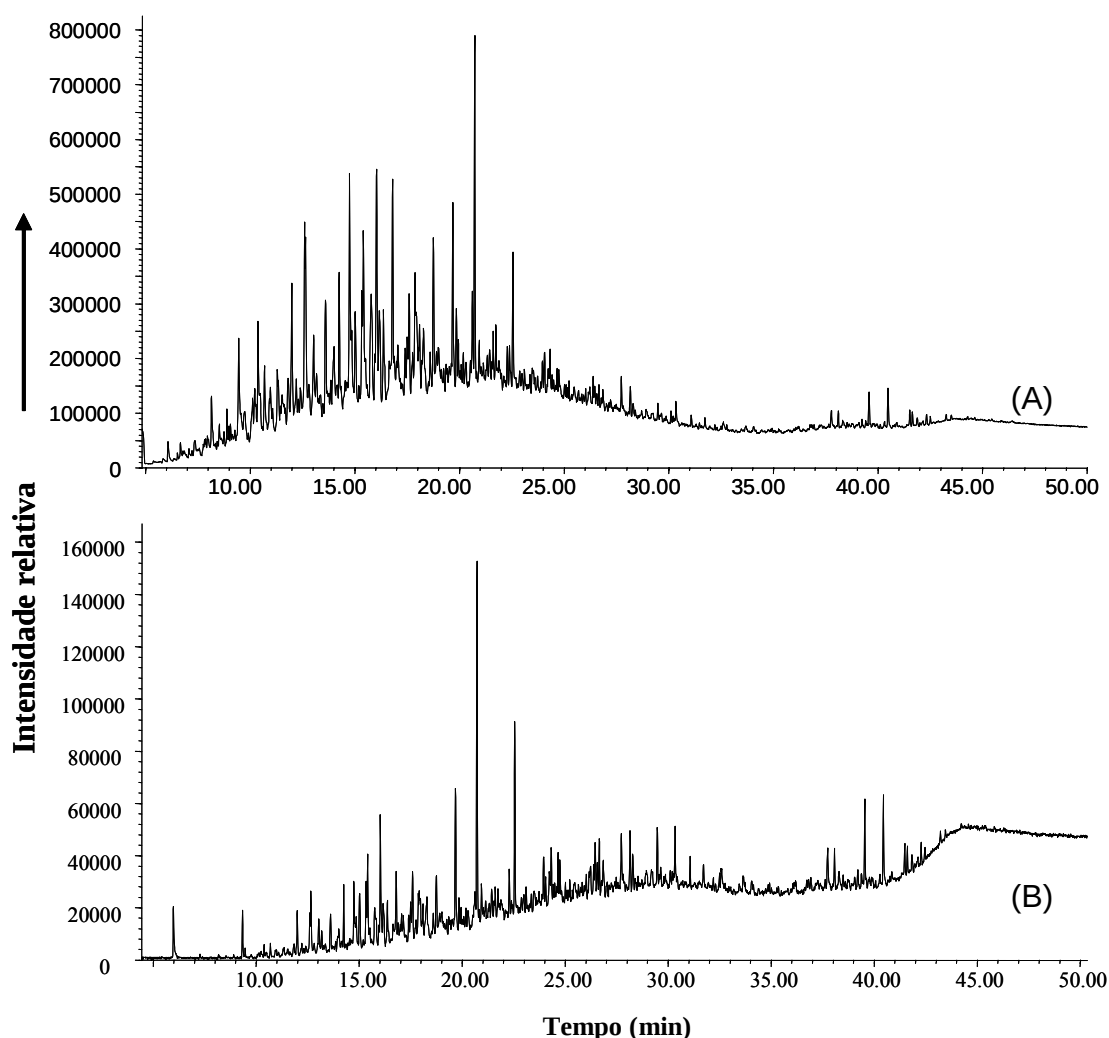


Figura 2. Cromatogramas de íons totais do óleo cru remanescente no (A) controle abiótico e no (B) ensaio de biodegradação.

O petróleo Marlin apresenta baixa concentração de *n*-parafinas, por isso, é considerado um óleo já biodegradado, apresentando maior concentração de compostos mais pesados. Isso já era esperado devido ao seu °API, que o caracteriza como um petróleo pesado. Através dos cromatogramas, é possível observar que as concentrações dos compostos mais leves diminuíam, aumentando a proporção de compostos mais pesados (maior tempo de retenção) em relação aos compostos leves (menor tempo de retenção).

Os biomarcadores presentes em combustíveis fósseis mais estudados são: *n*-alcanos, hidrocarbonetos isoprenóides, terpanos e esteranos.

Os *n*-alcanos são caracterizados pelos fragmentos m/z 71, 85 e 99. Já os isoprenóides são caracterizados pelos fragmentos m/z 113, 183 e 197, sendo o pristano e fitano os mais comumente encontrados (AZEVEDO, 1990).

A Figura 3 apresenta os fragmentogramas m/z 85 do óleo cru remanescente no controle abiótico e no ensaio de biodegradação. Podemos verificar a presença das *n*-parafinas e dos isoprenóides pristano e fitano. Após o processo de biodegradação a concentração desses compostos reduz significativamente (Figura 3(B)). É válido ressaltar que as análises de CG-EM nos fornecem informações qualitativas a respeito das amostras, contudo, foi possível comparar as amostras quantitativamente através da intensidade dos picos, pois as concentrações iniciais de óleo cru nos dois experimentos eram iguais.

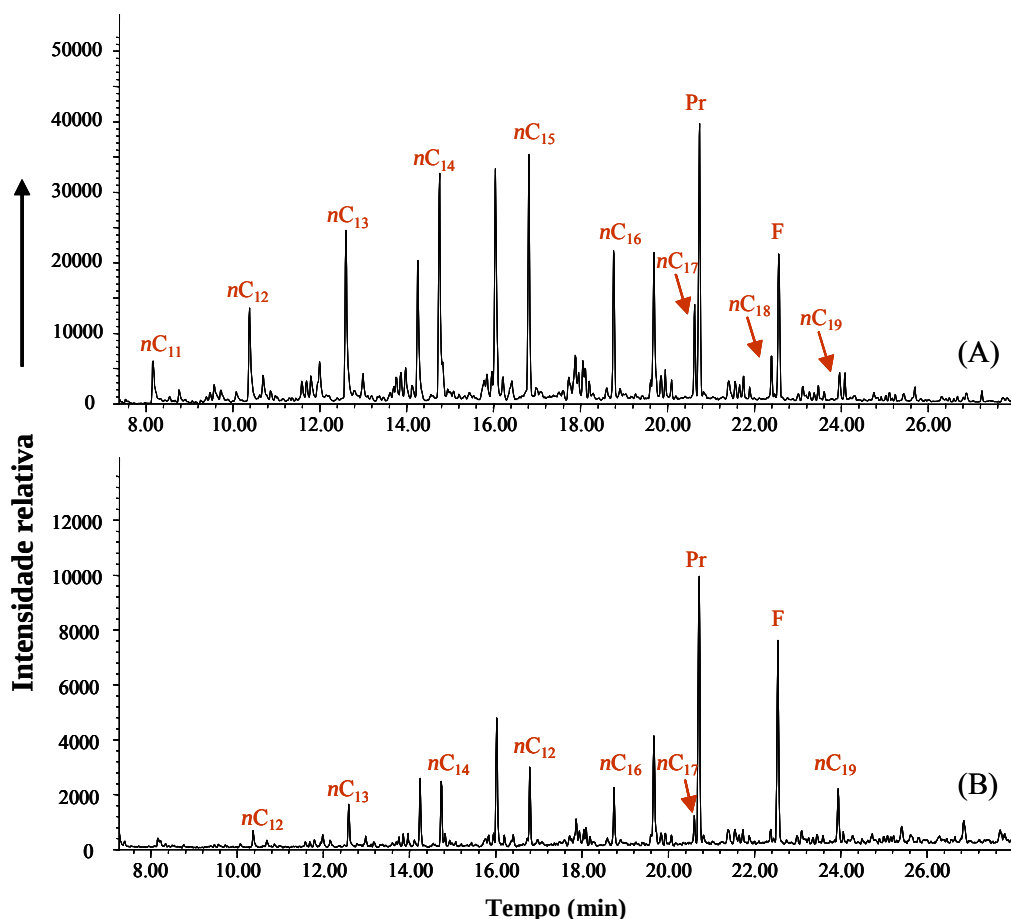


Figura 3. Fragmentogramas m/z 85 do óleo cru remanescente no (A) controle abiótico e no (B) ensaio de biodegradação.

Os terpanos podem ser divididos em três grupos principais: tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos. Os terpanos tricíclicos ocorrem como uma série homóloga com um número de átomos

de carbono variando de C_{19} até C_{54} . Os terpanos tetracíclicos são restritos a compostos de C_{24} a C_{27} , e derivam, possivelmente da degradação de triterpanos pentacíclicos (WIEDEMANN, 2006).

Hopanos são os mais comuns e bem estudados terpenóides pentacíclicos presentes em sedimentos ricos em matéria orgânica e petróleos. A cadeia lateral na posição C-21 pode ter até oito carbonos, originando os hopanos estendidos que variam de C_{27} a C_{35} e que não incluem o membro C_{28} , o qual é menos comum (WIEDEMANN, 2006).

A Figura 4 apresenta fragmentogramas m/z 191, característico dos terpanos. Foi possível detectar a presença de alguns terpanos tricíclicos (Tr) e alguns hopanos (H). Contudo, não foi possível afirmar que tais compostos tenham sido consumidos pelo microrganismo em questão, pois a diferença entre a abundância dos terpanos presentes óleo remanescente no controle abiótico e no ensaio de biodegradação não foi muito expressiva. Porém, as abundâncias do Tr_{20} e Tr_{21} diminuíram em relação à abundância do Tr_{23} , indicando uma grande possibilidade de ter ocorrido a degradação desses terpanos de menores pesos moleculares.

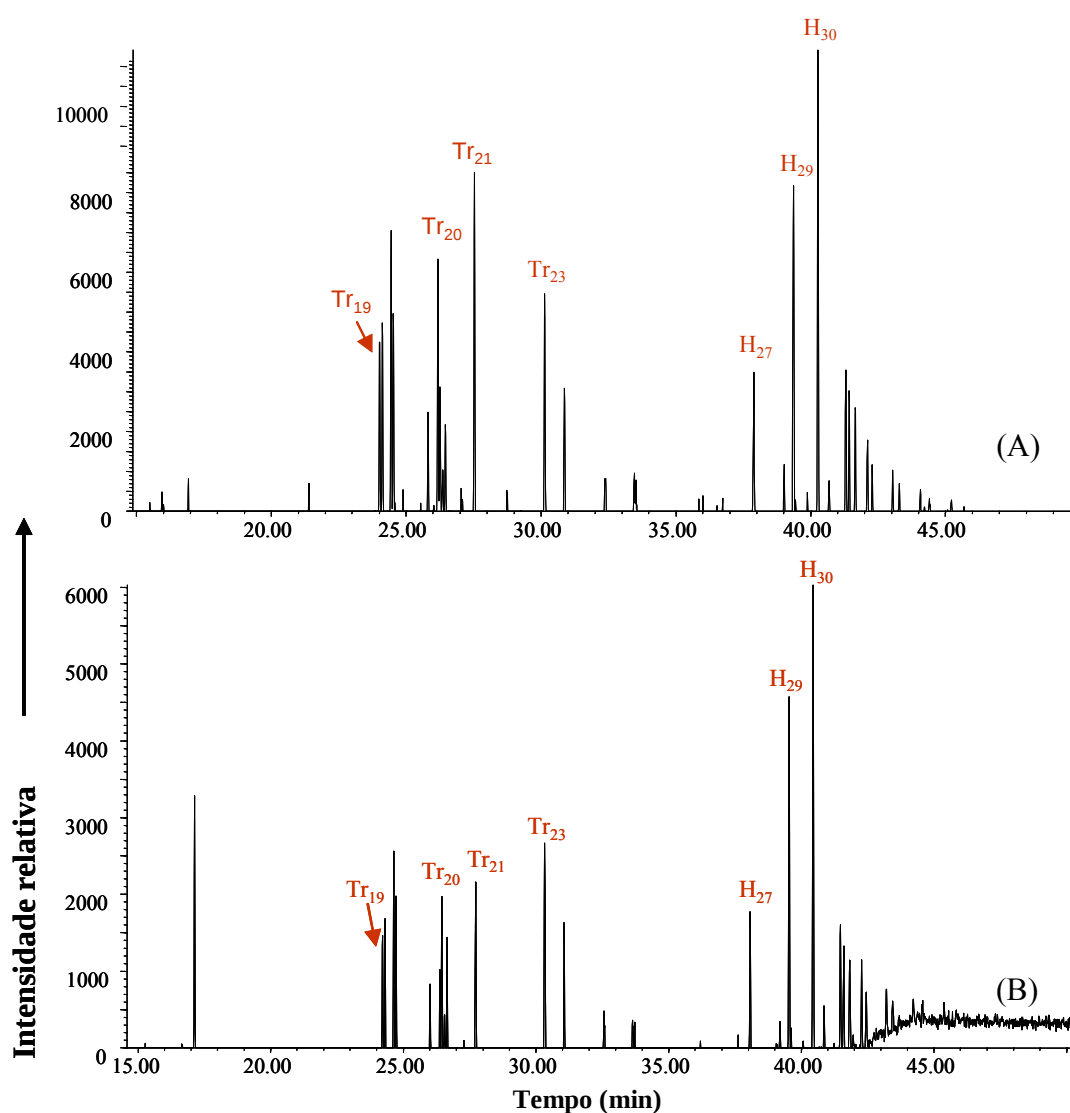


Figura 4. Fragmentogramas m/z 191 do óleo cru remanescente no (A) controle abiótico e no (B) ensaio de biodegradação.

Além destes compostos também foram analisados os hidrocarbonetos aromáticos cujos biomarcadores são os esteranos monoaromáticos e triaromáticos, fenantrenos e metilfenantrenos, naftalenos e metilnaftalenos (WIEDEMANN, 2006).

A classe dos naftalenos, metilnaftalenos, dimetilnaftalenos e trimetilnaftalenos são caracterizadas pelos fragmentos m/z 128, m/z 142, m/z 156 e m/z 170, respectivamente. A Figura 5 mostra os fragmentogramas referentes a essas classes.

É possível verificar que o naftaleno foi facilmente consumido por *Y. lipolytica*, sendo totalmente degradado no ensaio de biodegradação. Os grupos dos metilnaftalenos e dos dimetilnaftalenos também foram consumidos pela levedura. A biodegradação desses compostos parece seguir uma ordem. Após a degradação do naftaleno, a biodegradação do grupo dos metilnaftalenos se intensifica, o que pode ser observado através da diminuição da abundância dos metilnaftalenos em relação aos dimetilnaftalenos. Em seguida, com a ausência dos metilnaftalenos é a vez dos dimetilnaftalenos sofrerem degradação, o que também pode ser observado através da diminuição da abundância dos dimetilnaftalenos em relação aos trimetilnaftalenos. Contudo, os trimetilnaftalenos também foram consumidos, porém em menor quantidade que os outros grupos, possivelmente porque sua degradação só seria efetiva após a ausência de todos os compostos mais facilmente assimiláveis (naftalenos, metilnaftalenos e dimetilnaftalenos).

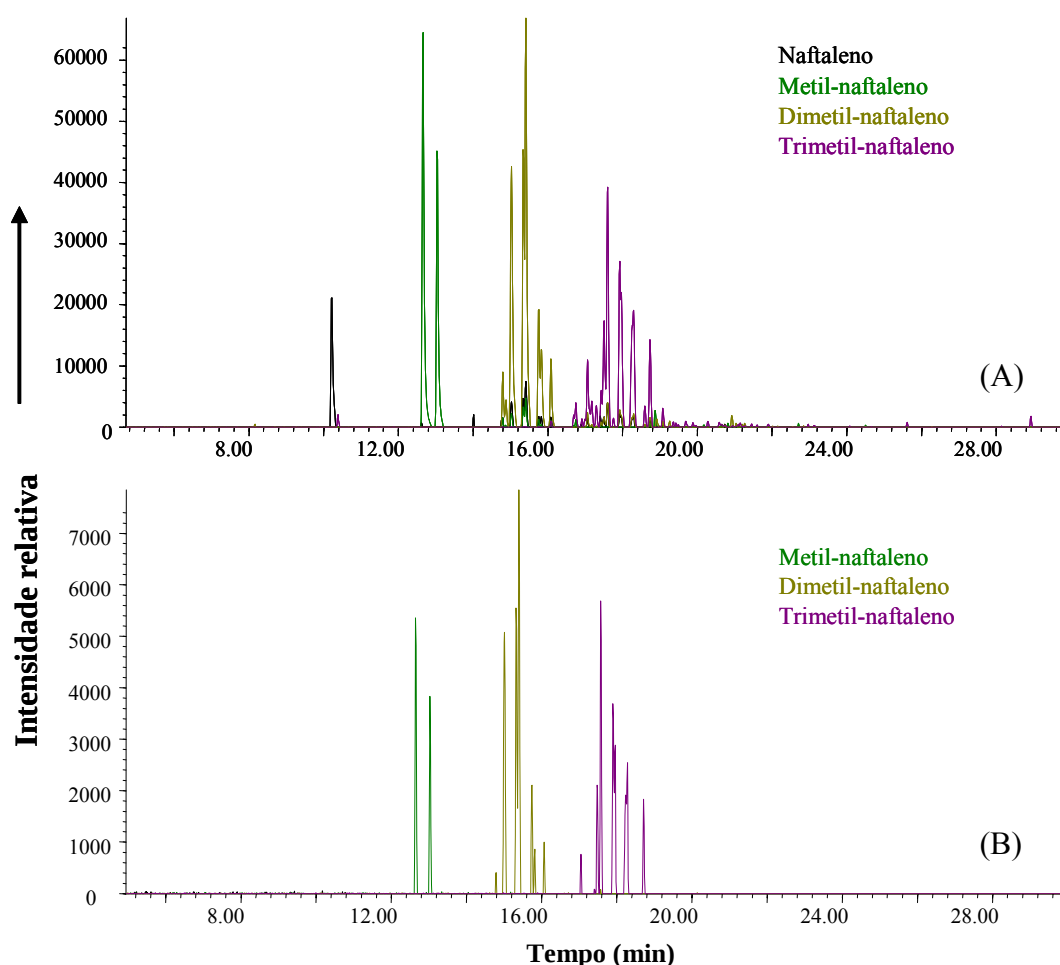


Figura 5. Fragmentogramas m/z 128, m/z 142, m/z 156 e m/z 170 do óleo cru remanescente no (A) controle abiótico e no (B) ensaio de biodegradação.

A classe dos fenantrenos, metilfenantrenos e dimetilfenantrenos são caracterizadas pelos fragmentos m/z 178, m/z 192 e m/z 206, respectivamente. A Figura 6 mostra os fragmentogramas referentes a essas classes.

Y. lipolytica é capaz de absorver compostos triarômáticos. A biodegradação desses compostos parece seguir a mesma sequência dos diarômáticos. O fenantreno é mais facilmente assimilável, seguido dos metilfenantrenos e dimetilfenantrenos.

Os resultados estão de acordo com os obtidos por CHALLIN *et al.* (2004). CHALLIN *et al.* (2004) analisaram a capacidade biodegradadora de quatro leveduras, sendo uma das cepas da espécie *Yarrowia lipolytica*. Esta espécie foi capaz de consumir *n*-alcanos, isoalcanos, pristano, fitano, alcanos cíclicos, hidrocarbonetos aromáticos e até mesmo alguns aromáticos policíclicos.

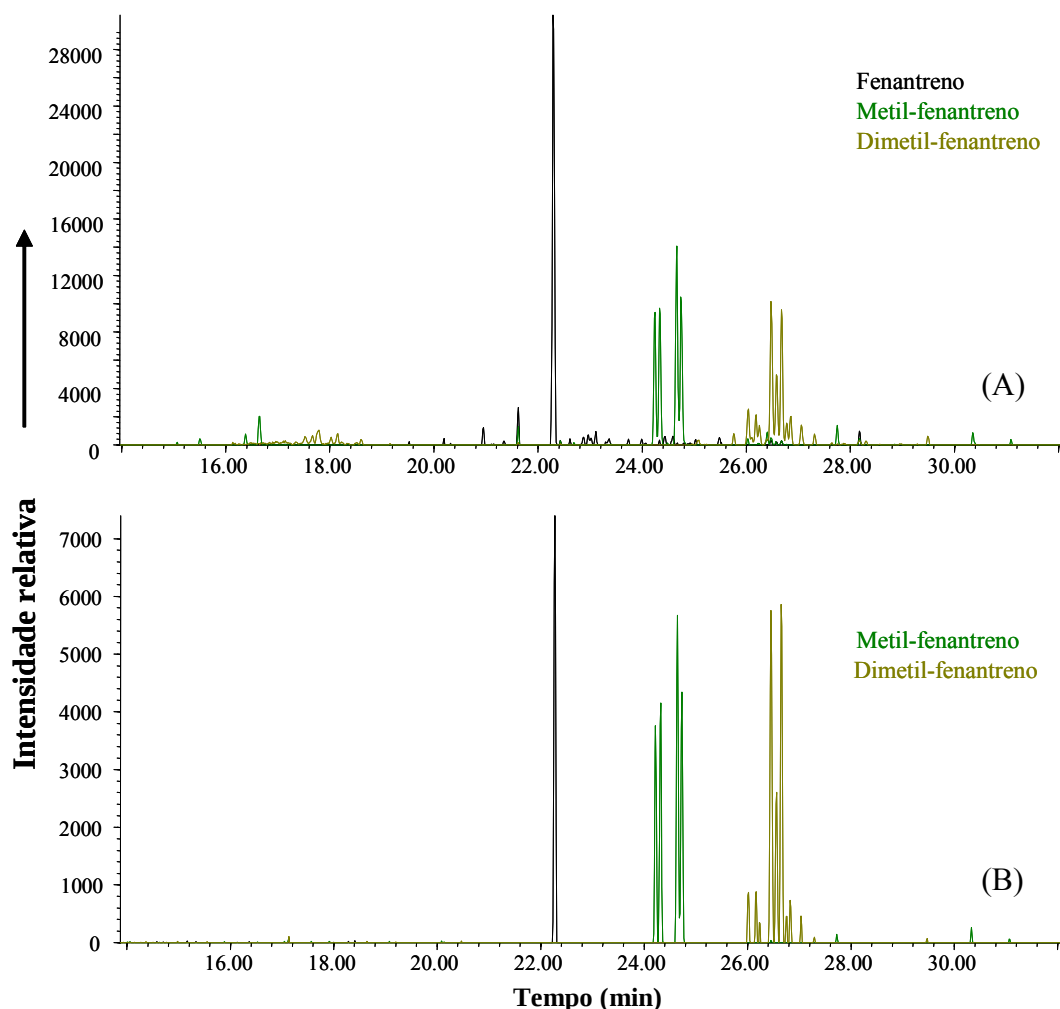


Figura 6. Fragmentogramas m/z 178, m/z 192 e m/z 206 do óleo cru remanescente no (A) controle abiótico e no, (B) ensaio de biodegradação.

Conclusões

Y. lipolytica IMUFRJ 50682 é uma levedura com potencial para aplicação em processos de biorremediação de óleo cru, se mostrando eficiente na degradação de hidrocarbonetos. Os compostos degradados por *Y. lipolytica* incluem *n*-parafinas, isoprenóides como o pristano e o fitano, hidrocarbonetos diarômáticos como o naftaleno, metilnaftalenos, dimetilnaftalenos e trimetilnaftalenos, e hidrocarbonetos triarômáticos como fenantreno, metilfenantreno e trimetilfenantreno.

Agradecimentos

Agradeço a Professora Débora Almeida por disponibilizar os experimentos do Laboratório LADETEC para as análises de CG-MS.

Agradeço também o apoio financeiro da Agência Nacional do Petróleo – ANP – e da Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP – por meio do Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor de Petróleo e Gás – PRH-ANP/MCT, em particular ao PRH 13, da Escola de Química - Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural.

Referências Bibliográficas

AMARAL, P. F. F. Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico. Dissertação (Doutorado em Ciências), EQ – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2007

AZEVEDO, D. A., Análise de hidrocarbonetos de Tasmanitas e Síntese de Terpano Tricíclico C₂₀ Desmetilado em C₈. Dissertação (Mestrado em Ciências) – IQ – Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1990.

CHALLIN, F.; FLECHE, A. L.; BURY, E.; PHANTAVONG, Y.; GRIMONT, P.; SALIOT, A. e OUDOT, J. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in Microbiology* v. 155, pp. 587–595, 2004.

FELICE B.D.; PONTECORVO G. e CARGAGNA M. Degradation of waste waters from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 and *Pseudomonas putida*. *Acta Biotechnologica*, v. 17(3), pp. 231 – 239, 2004.

HAEGLER, A.N. e MENDONÇA-HAEGLER, L.C. Yeast from marine and astuarine waters with different levels of pollution in the State of Rio de Janeiro, Brazil, *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 41(1), pp.173-178, 1981.

PETROBRAS. Disponível em <<http://www2.petrobras.com.br/portal/petrobras.htm>>. Acesso em: 30 de abril de 2009.

RON, E. Z. e ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, v.13, pp.249-252, 2002.

WIEDMANN, L.S.M. Caracterização geoquímica de óleos da bacia sedimentar brasileira. Dissertação (Doutorado em Ciências), COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 2006.