

---

## Crescimento de rizobactérias amazônicas em meios de cultura contendo óleo residual de soja

### Growth of Amazonian rhizobacteria in culture media containing residual soybean oil

---

**Suziane Pinto Rodrigues**ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5991-7716>

Universidade do Estado do Amazonas, Brasil

E-mail: [spr.dbb22@uea.edu.br](mailto:spr.dbb22@uea.edu.br)**Nadionara Costa Menezes**ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9716-0822>

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil

E-mail: [nadionaracosta@gmail.com](mailto:nadionaracosta@gmail.com)**Cassiane Minelli de Oliveira**ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4827-9955>

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil

E-mail: [cassyminelli@gmail.com](mailto:cassyminelli@gmail.com)**Luiz Antonio de Oliveira**ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2008-7292>

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil

E-mail: [luiz.oliveira@inpa.gov.br](mailto:luiz.oliveira@inpa.gov.br)

---

#### RESUMO

Os óleos vegetais residuais representam um risco ambiental quando descartados incorretamente ou em derramamentos de grandes volumes, causando danos que vão desde a formação de filmes oleosos em superfícies, podendo liberar de moléculas tóxicas para os seres vivos. Com isso, o objeto foi verificar o potencial de crescimento em óleo residual de soja por rizobactérias isoladas no Estado do Amazonas. Foram realizados experimentos com 61 rizobactérias, avaliando seus crescimentos em meio de cultura contendo meios de cultivo YMA, Extrato de levedura e INPA acrescidos de óleo residual de soja, e incubadas por 96 horas a  $\pm 28$  °C. Do total de 61 rizobactérias, 45 mostraram crescimentos considerados elevados em meio YMA contendo óleo residual de soja. No meio contendo apenas extrato de levedura e óleo de soja, observou-se que 46 rizobactérias cresceram muito bem. O meio INPA + óleo residual foi classificado como regular ou péssimo. As rizobactérias INPA R266, INPA R288, INPA R318, INPA R672, INPA R843 e INPA R969 mostraram-se como as mais promissoras do total de 61 rizobactérias testadas, pois apresentaram as melhores notas nos três meios testados já nas primeiras 24 horas de crescimento.

**Palavras-chave:** Tolerância; Biorremediação; Reação enzimática.

---

## ABSTRACT

Residual vegetable oils pose an environmental risk when discarded incorrectly or in large-volume spills, causing damage ranging from the formation of oily films on surfaces, which can release molecules that are toxic to living beings. Therefore, the objective was to verify the growth potential of residual soybean oil by rhizobacteria isolated in the State of Amazonas. Experiments were carried out with 61 rhizobacteria, evaluating their growth in culture medium containing YMA, yeast extract and INPA culture media plus residual soybean oil, and incubated for 96 hours at  $\pm 28$  °C. Of the total of 61 rhizobacteria, 45 showed high growth in YMA medium containing residual soybean oil. In the medium containing only yeast extract and soybean oil, 46 rhizobacteria were shown to grow very well. The INPA medium + residual oil was classified as fair or poor. The rhizobacteria INPA R266, INPA R288, INPA R318, INPA R672, INPA R843 and INPA R969 proved to be the most promising of the total of 61 rhizobacteria tested, as the best grades were confirmed in the three media tested in the first 24 hours of growth.

**Keywords:** Tolerance; Bioremediation; Enzymatic reaction.

---

## INTRODUÇÃO

A poluição dos solos e ambientes aquáticos é um problema atual e sua remediação é um desafio, pois leva à absorção e acúmulo de substâncias químicas tóxicas na cadeia alimentar, causando danos à vida vegetal e animal (KUMAR *et al.*, 2012; BROWN *et al.*, 2016). Esses prejuízos podem ser causados por descarte de óleos no meio ambiente, e embora haja avanços para sua diminuição, ainda ocorrem grandes vazamentos e negligências (PUBLIC HEALTH, 1963; MCKELVEY *et al.*, 1980). Muitos locais poluídos foram identificados, representando ameaças à qualidade da água potável e à saúde das atuais e futuras gerações (BUCAS; SALIOT, 2002). Diversas técnicas de remediação foram desenvolvidas para lidar com essa situação, sendo o aterro de solo contaminado o método mais comum. Porém, a remediação biológica, combinada com outras abordagens, tornou-se uma técnica estabelecida na restauração do solo, apesar de questões de custo e tempo (MAKKAR *et al.*, 2003; JACQUES *et al.*, 2010).

O óleo de soja é considerado, entre os óleos vegetais, o segundo com maior produção no mercado mundial, com 61,61 milhões de toneladas e um consumo de 60,09 milhões de toneladas (USDA, 2023). No entanto, seu descarte necessita de maiores estudos, pois de acordo com a Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS) é classificado como resíduo sólido, por ser um descarte resultante das atividades humanas (BRASIL, 2010). Além disso, quando é descartado de forma incorreta, passa a ser um poluidor, podendo impactar diretamente o meio urbano, trazer danos ao meio ambiente, e contribuir para reduzir a permeabilidade do solo e contaminar lençóis freáticos (MIGUEL; FRANCO, 2014; COSTA *et al.*, 2016; LARSEN *et al.*, 2019).

Ao observarmos a surpreendente diversidade microbiana em solos e nódulos de leguminosas existentes na Amazônia e a sua importância na decomposição de resíduos, na ciclagem de nutrientes e nas suas associações com outros organismos, torna-se importante seus estudos voltados para a biorremediação e recomposição ambiental, eliminando ou mitigando os impactos causados pela ação humana (MARTINS *et al.*, 2008; MACIEL *et al.*, 2010; BRITO *et al.*, 2016; ATHALAH *et al.*, 2019).

Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi verificar o potencial de crescimento em óleo residual de soja por rizobactérias isoladas de nódulos pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia (LEBMAM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

## METODOLOGIA

### Reativação de isolados bacterianos

Foram selecionadas 61 rizobactérias com propenso potencial biotecnológico em estudos anteriores (Tabela 1).

Tabela 1. Rizobactérias selecionadas para a avaliação de crescimento pela técnica de Oliveira e Magalhães (1999).

Bactéria	Solo/Planta	Isolamento	Referência bibliográfica
INPA R001			
INPA R012			
INPA R014	Floresta <sup>13</sup>	Solo	
INPA R028			
INPA R046			
INPA R233	<i>Inga edulis</i> (Ingá) <sup>2</sup>	Nódulo	
INPA R266			
INPA R268	<i>Inga sp.</i> (Ingá) <sup>16</sup>	Nódulo	
INPA R269			
INPA R276	<i>Inga edulis</i> (Ingá) <sup>16</sup>	Nódulo	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2021
INPA R285			
INPA R287	<i>Indigofera sp.</i> (Anil bravo) <sup>16</sup>	Nódulo	
INPA R288			
INPA R292			
INPA R296	<i>Inga edulis</i> (Ingá) <sup>16</sup>	Nódulo	
INPA R298	<i>Mimosa pudica</i> (Maria-fecha-a-porta) <sup>16</sup>	Nódulo	
INPA R318			
INPA R325	<i>Indigofera sp.</i> (Anil bravo) <sup>16</sup>	Nódulo	
INPA R549	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo) <sup>15</sup>	Nódulo	
INPA R561			
INPA R577	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo) <sup>14</sup>	Nódulo	BRITO, 2013
INPA R599			

INPA R618	<i>Inga edulis</i> (Ingá) <sup>8</sup>	Nódulo	
INPA R629	<i>Vigna unguiculata</i> (Feijão Caupi) <sup>10</sup>	Nódulo	
INPA R634			
INPA R672	<i>Cedrelinga catenaeformis</i> (Cedrorana) <sup>17</sup>	Nódulo	
INPA R674			
INPA R721	<i>Inga edulis</i> (Ingá) <sup>12</sup>	Nódulo	
INPA R722			
INPA R739	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo) <sup>9</sup>	Nódulo	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2021
INPA R761			
INPA R781	<i>Desmodium triflorum</i> (Amor-do-campo) <sup>11</sup>	Nódulo	
INPA R792	<i>Inga edulis</i> (Ingá) <sup>11</sup>	Nódulo	
INPA R815	Capoeira de 2 anos <sup>13</sup>	Solo	
INPA R816			
INPA R820			
INPA R825	Floresta <sup>13</sup>	Solo	
INPA R843			
INPA R906			
INPA R917	<i>Portulaca oleracea</i> L. (Beldroegra) <sup>3</sup>	Solo	
INPA R920	<i>Capsicum</i> spp. (Pimenta) <sup>3</sup>	Solo	
INPA R922	<i>Echinochloa</i> spp. (Canarana) <sup>3</sup>	Solo	
INPA R927			
INPA R931	<i>Acacia mangium</i> L. (Acácia) <sup>3</sup>	Solo	
INPA R936	<i>V. unguiculata</i> L. (Feijão-caupi) <sup>4</sup>	solo	
INPA R942	<i>Capsicum</i> spp. (Pimenta) <sup>3</sup>	Solo	CHAGAS JUNIOR, 2007
INPA R949	<i>Acacia mangium</i> L. (Acácia) <sup>5</sup>	Solo	
INPA R961	<i>Acacia mangium</i> L. (Acácia) <sup>16</sup>	Solo	
INPA R968	<i>Citrus reshni</i> Hort. (Tangerina) <sup>16</sup>	Solo	
INPA R969	Sem plantio <sup>16</sup>	Solo	
INPA R972	<i>Carica papaya</i> L. (Mamão) <sup>7</sup>	Solo	
INPA R976	<i>Carica papaya</i> L. (Mamão) <sup>6</sup>	Solo	
INPA R982	<i>Solanum melongena</i> L. (Berinjela) <sup>6</sup>	Solo	
INPA R993	<i>T. grandiflorum</i> (Cupuaçu) <sup>1</sup>	Solo	
INPA R999			
INPA R1001			
INPA R1003			
INPA R1004			
INPA R1010	<i>Inga edulis</i> (Ingá) <sup>12</sup>	Solo	
INPA R1062			
INPA R1069	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo) <sup>12</sup>	Solo	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2021

Barreirinha, AM (1); Brasileirinho, Manaus, AM (2); Carreiro da Várzea, AM(3); Comunidade de Marchantaria, Careiro da Várzea, AM (4); Comunidade do Catalão, Carreiro da Várzea, AM (5); Costa do Açutúba, Município de Iranduba, AM (6); Costa do Laranjal, Município de Manacapuru, AM (7); Estrada do Jandira; Beira do Rio Solimões, Várzea S 030 15' 21,3" W 0600 15' 17,2", Iranduba, AM (8); Estrada do Acajatuba S 3°13'36,1" W 60°34'20,5", Manacapuru – AM (9); Jandira, propriedade São João S 030 15' 20,0" W 0600 15' 33,1", Iranduba, AM (10); Km 2 S

2°4'3,7" W 60°0'7,7" , Balbina, AM (11); Lago do Paru S 3°15'24,7" W 60°32'3,4" , Manacapuru, AM (12); Novo Ayrão, AM (13); Ramal do Caldeirão km3 S 30 13' 41,9" W 600 13' 27,8" , Iranduba, AM (14); Ramal do Caldeirão, Terra firme, km 3 S 30 12' 26" W 600 12' 2,5" , Iranduba, AM (15); Rio Preto da Eva, AM (16); Viveiro de Urucu S 040 53' 15.1" W 0650 13' 31.5" , Coari, AM (17).

Essas rizobactérias estão preservadas em tubos com meio YMA (*Yeast Mannitol Agar*), inclinado, cuja formulação é: manitol (10,0 g.L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5 g.L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (0,2 g.L<sup>-1</sup>), NaCl (0,1 g.L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (0,5 g.L<sup>-1</sup>) e ágar (15 g.L<sup>-1</sup>), adicionado água destilada (20%, v/v) e estocado em temperatura ambiente (VINCENT, 1970).

Para a reativação, essas rizobactérias foram inoculadas por esgotamento em placas de Petri contendo meio YMA e incubadas em Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) por 96 horas a ± 28 °C.

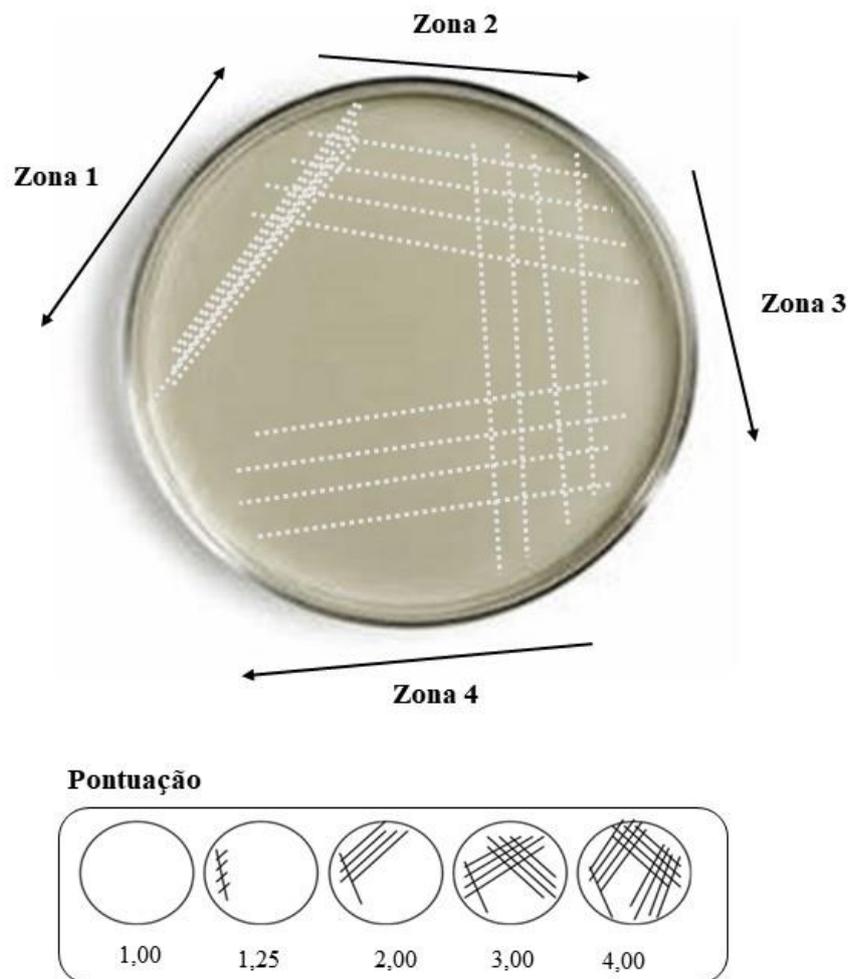
### **Seleção de rizobactérias para crescimento em meios de cultivo contendo óleo residual de soja**

O critério de seleção foi pela análise visual a partir do crescimento bacteriano em meio ágar YMA, meio ágar Extrato de Levedura (0,5 g.L<sup>-1</sup>) e meio ágar mineral INPA (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,4 g.L<sup>-1</sup>), Ca(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (0,02 g.L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,5 g.L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5 g.L<sup>-1</sup>), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (2,5 g.L<sup>-1</sup>), FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,05 g.L<sup>-1</sup>), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,05 g.L<sup>-1</sup>), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,01 g.L<sup>-1</sup>), CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,01 g.L<sup>-1</sup>), MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,01 g.L<sup>-1</sup>), Na<sub>4</sub>SeO<sub>3</sub> (0,01 g.L<sup>-1</sup>) e ágar (15g.L<sup>-1</sup>)) (MOURA; OLIVEIRA, 2017), em placa de Petri. Houve espalhamento de 200 µL de óleo residual de soja nos três meios, coletado em um estabelecimento comercial localizado na Zona Urbana de Manaus, na temperatura de ±28 °C, em quadruplicata, sendo analisada por 96 horas. Foram consideradas rizobactérias com crescimento elevado, aquelas com nota acima de 3,06 nos meios testados, pela técnica de Oliveira e Magalhães (1999), (Figura 1, Tabela 2).

Segundo Oliveira e Magalhães (1999), este método facilita a avaliação de muitas bactérias substituindo o método de diluição em placas, utilizando menos recursos laboratoriais e sendo realizado em menos tempo. Ao longo desses anos esse método vem sendo usado em diversas publicações com bastante precisão nos processos de seleção inicial de bactérias para diferentes fins servindo de base para publicações em diversas revistas científicas, capítulos de livros, dissertações e teses (HARA; OLIVEIRA, 2004;

2005; 2007; CHAGAS JR et al., 2009; BRITO et al., 2016; COSTA et al., 2016; MENEZES; OLIVEIRA, 2016; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2016; CAUPER et al., 2017; MOURA; OLIVEIRA, 2017).

Figura 1. Método de riscagem para avaliação do crescimento de bactérias.



Zona 1. Uma linha. Riscagem de uma alça de platina diversas vezes em ambas as direções indicadas pela seta. Zona 2. Quatro linhas de riscagem, usando-se um risco por linha na direção indicada pela seta. Zona 3 e 4. Semelhante a zona 2. \*A alça deve ser flambada no fogo para cada zona de riscagem.

Fonte: Oliveira e Magalhães (1999).

Tabela 2. Faixa de pontuação para avaliação do crescimento bacteriano.

Graus de crescimentos	Intervalos de pontuação
Baixo	1,00 - 2,00
Médio	2,06 - 3,00
Alto	3,06 - 4,00

Fonte: Oliveira e Magalhães (1999).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 3 apresenta a capacidade de crescimento das 61 rizobactérias amazônicas, coletadas de nódulo de leguminosas e de solos, nos três diferentes meios de cultura contendo óleo residual de soja, examinando sua capacidade em usar o manitol (meio YMA), extrato de levedura (Extrato de levedura) e micronutrientes ( $\text{Se}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) (Figura 2).

Figura 2. Crescimento bacteriano (INPA R028) em três diferentes meios de cultivo enriquecido com óleo residual de soja, usando a metodologia de Oliveira e Magalhães (1999).



Para verificar a capacidade de crescimento bacteriano em meio contendo óleo residual de soja, foi utilizada a metodologia de Oliveira e Magalhães (1999), que é baseada na técnica de diluição seriada, porém em placa de Petri. As bactérias com alta capacidade de crescimento no meio apresentaram notas superiores a 3,06 e, nota inferior a 2,0 quando apresentou dificuldades para aproveitamento dos constituintes do meio de cultivo. De acordo com a rapidez de desenvolvimento microbiano (nota  $>3,06$ ), foi

possível avaliar sua adaptação e capacidade de usar o óleo residual de soja e/ou outra fonte de carbono nos meios.

Do total de 61 rizobactérias testadas, sete (INPA R046, INPA R298, INPA R739, INPA R761, INPA R917, INPA R961, INPA R1062) não mostraram crescimento visível nos três meios de cultura (Tabela 3). Esses resultados indicam que elas são sensíveis à presença do óleo residual de soja, uma vez que mesmo no meio YMA elas não mostraram crescimento visível. Esse é o meio mais usado para o crescimento dessas rizobactérias desde de 1960 (Vincent, 1970) e, pelo fato de ter sido utilizado para o isolamento de toda as bactérias testadas no presente estudo, bem como nos trabalhos de rotina e publicações do nosso grupo de pesquisas ((HARA; OLIVEIRA, 2004; 2005; CHAGAS JR *et al.*, 2009; BRITO *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2016; MENEZES; OLIVEIRA, 2016; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2016; CAUPER *et al.*, 2017; MOURA; OLIVEIRA, 2017).

As rizobactérias INPA R549, INPA R599, INPA R634, INPA R721, INPA R927, INPA R942, INPA R972, INPA R1069 também mostraram dificuldades para crescer nesses meios, mas apresentando algum crescimento visível, dependendo do meio usado.

Tabela 3. Crescimento de rizobactérias amazônicas em meio sólido contendo YMA (M1), Extrato de levedura (M2) e INPA (M3) a  $\pm 28$  °C de incubação.

Bactéria	M1	M2	M3									
	24 horas			48 Horas			72 Horas			96 Horas		
INPA R001	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R012	4,00	4,00	1,75	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	2,00
INPA R014	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R028	4,00	4,00	1,17	4,00	4,00	1,25	4,00	4,00	1,25	4,00	4,00	1,25
INPA R046	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R233	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R266	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	2,00
INPA R268	4,00	4,00	1,17	4,00	4,00	1,25	4,00	4,00	1,25	4,00	4,00	1,25
INPA R269	4,00	4,00	1,25	4,00	4,00	1,25	4,00	4,00	1,25	4,00	4,00	1,25
INPA R276	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R285	4,00	4,00	1,67	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R287	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R288	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	2,00
INPA R292	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R296	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R298	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R318	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	2,00

INPA R325	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R549	1,75	1,00	1,00	1,75	1,00	1,00	1,75	1,00	1,00	1,75	1,00	1,00
INPA R561	4,00	1,00	1,00	4,00	1,00	1,00	4,00	1,00	1,00	4,00	1,00	1,00
INPA R577	4,00	4,00	1,25	4,00	4,00	1,25	4,00	4,00	1,25	4,00	4,00	1,25
INPA R599	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	1,00
INPA R618	4,00	4,00	1,25	4,00	4,00	1,25	4,00	4,00	1,25	4,00	4,00	1,25
INPA R629	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R634	1,75	1,75	1,00	1,75	1,75	1,00	1,75	1,75	1,00	1,75	1,75	1,00
INPA R672	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	1,75	4,00	4,00	1,75	4,00	4,00	2,00
INPA R674	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R721	1,25	2,00	1,00	1,25	2,00	1,00	1,25	2,00	1,00	1,25	2,00	1,00
INPA R722	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R739	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R761	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R781	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R792	4,00	1,25	1,00	4,00	1,25	1,00	4,00	1,25	1,00	4,00	1,25	1,00
INPA R815	3,42	4,00	1,00	3,83	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R816	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R820	3,67	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R825	3,67	4,00	2,00	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	2,00
INPA R843	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	2,00
INPA R906	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R917	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R920	4,00	4,00	1,25	4,00	4,00	1,25	4,00	4,00	1,25	4,00	4,00	1,25
INPA R922	4,00	4,00	1,17	4,00	4,00	1,25	4,00	4,00	1,25	4,00	4,00	1,25
INPA R927	1,00	1,25	1,00	1,00	1,25	1,00	1,00	1,25	1,00	1,00	1,25	1,00
INPA R931	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R936	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R942	1,25	3,00	1,00	1,25	3,00	1,00	1,25	3,00	1,00	1,25	3,00	1,00
INPA R949	1,00	2,67	1,25	1,00	3,00	1,25	1,00	3,00	1,25	1,00	3,00	1,25
INPA R961	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R968	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R969	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	2,00
INPA R972	2,00	2,00	2,92	2,00	2,00	3,00	2,00	2,00	3,00	2,00	2,00	3,00
INPA R976	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R982	3,17	3,00	2,08	3,25	3,00	2,00	4,00	3,00	2,00	4,00	4,00	2,08
INPA R993	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R999	3,67	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R1001	3,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R1003	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R1004	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R1010	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA R1062	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R1069	1,42	4,00	1,00	1,50	4,00	1,00	1,50	4,00	1,00	1,50	4,00	1,00

Quanto à análise isolada dos meios, em 24 horas, do total de 61 rizobactérias, 45 mostraram crescimento classificado como ótimo em YMA (M1) (nota acima de 3,06), não havendo modificação das notas até as 96 horas de avaliação.

Ao se analisar os crescimentos no meio contendo apenas extrato de levedura e óleo de soja, observou-se, após 24 horas de incubação, que 42 das rizobactérias mostraram crescimentos elevados, aumentando para 46 após 96 horas de incubação.

Com relação ao meio INPA acrescido de óleo de soja, observou-se que nenhuma das 61 rizobactérias mostrou crescimento elevado após 24 horas e incubação, sendo que dessas, 42 apresentaram nota mínima, 1,0, que significa sem crescimento visível na placa de Petri. Essa situação não se alterou até as 96 horas de incubação, mostrando que esse meio de cultura não é apropriado para o crescimento e habilidade dessas rizobactérias crescerem e degradarem o óleo residual de soja, mesmo contendo alguns micronutrientes que compõem algumas enzimas degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo (MOURA; OLIVEIRA, 2017) aumentando para 45 em 48 horas.

O meio de cultura INPA possui os micronutrientes  $Se^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , considerados co-fatores enzimáticos essenciais para a atividade catalítica de muitas enzimas (CALLERA, 2017; ADALBERTO, 2005) e tampões fosfatos ( $KH_2PO_4$  e  $K_2HPO_4$ ), que desempenham papel crucial ao fornecer estabilidade de pH ao meio, evitando grandes oscilações de acidez ou alcalinidade que auxiliam na produção de ATP, essencial para uma variedade de funções metabólicas (DEANGELIS, 2022). E embora esses nutrientes possam influenciar em funções celulares associadas ao metabolismo bacteriano (JACQUES *et al.*, 2007), acelerando as taxas de reação enzimática pela promoção de um estado ativo das enzimas envolvidas no processo de crescimento, ao ser adicionado o óleo residual de soja observou-se que as bactérias não mostraram boa adaptação quando comparadas aos dois outros meios de cultivo, também enriquecidos com o óleo de soja.

Com isso, foi possível observar uma variação elevada de crescimento dessas bactérias, sendo que o crescimento acelerado por parte de algumas pode conferir vantagens competitivas na rizosfera em comparação às de crescimento lento; da mesma forma, mostra suas capacidades de adaptação em condições menos favoráveis (NORRIS, 1996; MOREIRA *et al.*, 1992).

A utilização de óleo residual de soja como substrato por rizobactérias, poderá permitir a produção de metabólitos microbianos de aplicação biotecnológica, como no

estudo de Lima *et al.* (2009), que através de uma cepa de *P. aeruginosa*, obteve produção de biossurfactante a partir de resíduos de óleo de soja em baixas taxas de aeração, sendo que em condições ótimas, esse processo resultou em 3,3 g/L de ramnose. Com essa mesma perspectiva, com uma mistura de óleo residual de fritura de soja, extrato de levedura e peptona, Nunes *et al.* (2021) conseguiram aumentar a expressão de enzima lipolítica pela levedura *Yarrowia lipolytica*. Do mesmo modo, Fickers *et al.* (2004), através do estudo sobre fontes de nitrogênio e carbono mais adequadas para a produção da lipase extracelular pelo mutante *Y. lipolytica*, observaram que por meio da disponibilidade desses nutrientes, foi possível obter maior produção enzimática.

A capacidade de adaptação de microrganismos a diferentes tipos de estresses nutricionais é de grande importância na área biotecnológica para a formulação de novas técnicas e produtos. A habilidade de se adaptar em ambientes ricos em óleos residuais de soja pode ser interessante no ponto de vista da biorremediação de áreas contaminadas por esgoto doméstico e/ou acidentes, tendo em vista que, um litro de resíduo lipídico pode afetar cerca de 1 milhão de litros de água natural e, quando submetido ao aquecimento, esse óleo pode se torna potencialmente tóxico (HOCEVAR *et al.*, 2012). Dessa forma, com esse conhecimento adquirido, é possível, por meio de técnicas mais avançadas, utilizar essas rizobactérias como potenciais biorremediadoras de ambientes contaminados.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Do total de 61 rizobactérias, 45 mostraram crescimentos considerados elevados em meio YMA contendo óleo residual de soja. Esse meio mostrou-se como o mais adequado para a degradação do óleo de soja após o seu uso em frituras, podendo contribuir para a biorremediação de ambientes contaminados por esse produto industrial.

No meio contendo apenas extrato de levedura e óleo de soja, observou-se que 46 rizobactérias cresceram muito bem.

O meio INPA + óleo residual foi classificado como regular ou péssimo para a finalidade de biorremediação de ambientes contaminados com óleo residual de soja.

As rizobactérias INPA R266, INPA R288, INPA R318, INPA R672, INPA R843 e INPA R969 mostraram-se como as mais promissoras do total de 61 rizobactérias testadas para a

degradação do óleo de soja após o seu uso em frituras, pois apresentaram as melhores notas nos três meios testados já nas primeiras 24 horas de crescimento.

## AGRADECIMENTOS

À FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas), pelo apoio financeiro que permitiu realizar essa pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, pelo amparo acadêmico disponibilizado.

## REFERÊNCIAS

ADALBERTO, P. R. **Produção, isolamento e caracterização de beta'-galactosidases de *Trichoderma reesei*: interação de íons metálicos na atividade enzimática**. 108f. Tese - Universidade Estadual Paulista. São Paulo, 2005.

ATHALAH, J. et al. Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. **Bioresource technology**, v. 280, p. 478-488, 2019.

BRASIL. Lei n. 12.305, de 2 de agosto de 2010. **Política nacional de resíduos sólidos (PNRS)**. Brasília, DF: Diário Oficial da União, nº 147. p. 03 de agosto de 2010.

BRITO, L. L.; MENEZES, N. C.; MINELLI-OLIVEIRA, C.; OLIVEIRA, L. A. Biodegradação de petróleo por isolados de rizóbios provenientes de solos amazônicos In: OLIVEIRA et al. (Eds.) **Diversidade Microbiana da Amazônia**. 1 ed. Manaus: Editora INPA, 2016, v.1, p. 41-46. 2016.

BRITO, L.L.C. Degradação de petróleo por isolados de rizóbios da Amazônia. 2013. 99 f. Dissertação (Biotecnologia e Recursos Naturais) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2013.

BROWN, L.D.; ULRICH, A.C. Bioremediation of oil spills on land. **Handbook of oil spill science and technology**, p. 395-406, 2014.

BUCAS, G.; SALIOT, A. Sea transport of animal and vegetable oils and its environmental consequences. **Marine pollution bulletin**, v. 44, n. 12, p. 1388-1396, 2002.

CALLERA, W. F. A. **Estudos de mecanismos redox enzimáticos por eletroquímica e modelagem computacional**. 97f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia). Universidade Estadual Paulista. São Paulo, 2017.

CARDINALE, B. J. *et al.* Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems. **Nature**, v. 443, n. 7114, p. 989-992, 2006.

CAUPER, F. R.M.; BRITO, L. L.; MINELLI-OLIVEIRA, C.; COSTA, S.S.; MENEZES, N. C.; OLIVEIRA, L. A. Potencial de produção de amilase por rizóbios isolados de nódulos de feijão caupi cultivado em solo da Amazônia In: OLIVEIRA et al.

(Eds.) **Diversidade Microbiana da Amazônia**. 1 ed. Manaus: INPA, v.2, p. 107-114, 2017.

CHAGAS JR, A. F. **Características agronômicas e ecológicas de rizóbios isolados de solos ácidos e de baixa fertilidade da Amazônia**. 2007. 172 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.

CHAGAS JR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A.N. Tolerância à acidez e alumínio tóxico por isolados de rizóbios de solos no Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v.39 (2), p.467 - 470, 2009.

COSTA, T.M. *et al.* Avaliação da velocidade específica de crescimento radial de fungos em óleo vegetal residual. **Revista de Estudos Ambientais**, v. 17, n. 2, p. 29-40, 2016.

DEANGELI, K. M. **Phosphate buffer**. Disponível em: <<https://interprepaswebblogbuffers.files.wordpress.com/2018/02/phosphate-buffer.pdf>> Acesso em: 30/09/2023.

FICKERS, P. *et al.* Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of applied microbiology**, v. 96, n. 4, p. 742-749, 2004.

HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.667 - 672, 2005.

HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo. Amazonas. **Acta Amazonica**, v.34, p.343 - 357, 2004.

HOCEVAR, L. *et al.* Application of multivariate analysis in mid-infrared spectroscopy as a tool for the evaluation of waste frying oil blends. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, p. 781-786, 2012.

JACQUES, R.J.S. *et al.* Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, p. 1192-1201, 2007.

JACQUES, R.J.S. *et al.* Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. **Ciência Rural**, v. 40, p. 280-287, 2010.

KUMAR, S. *et al.* Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 300-304, 2012.

LARSEN, I.; WEINSCHUTZ, R.; KOLICHESKI, M.B. Logística reversa dos óleos residuais em Curitiba estudo de caso em Santa Felicidade e projeto de educação à reciclagem. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 8, n. 1, p. 973-993, 2019.

LIMA, C. J. B. *et al.* Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* grown in residual soybean oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, p. 156-168, 2009.

MACIEL, C.C.S.; TAKAKI, G.M.C.; GUSMÃO, N. B. Potencialidade de fungos filamentosos em degradar óleos lubrificantes. **Revista Eclesiástica Brasileira**, p. 58-64, 2010.

MAKKAR, R.S.; ROCKNE, K.J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 22, n. 10, p. 2280-2292, 2003.

MARTINS, V.G.; KALIL, S.; COSTA, J.A.V. Co-produção de lipase e biosurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química nova**, v. 31, p. 1942-1947, 2008.

MCKELVEY, R.W.; ROBERTSON, I.; WHITEHEAD, P.E. Effect of non-petroleum oil spills on wintering birds near Vancouver. **Marine Pollution Bulletin**, v. 11, n. 6, p. 169-171, 1980.

MENEZES, N. C.; OLIVEIRA, L. A. Tolerância de rizóbios à acidez e ao alumínio In: OLIVEIRA et al. (Eds.) **Diversidade Microbiana da Amazônia**.1 ed. Manaus: Editora INPA, 2016, v.1, p. 156-161.

MIGUEL, A. C.; FRANCO, D. M. B. **Logística Reversa de óleo de cozinha usado**. v. 16, p. 32, 2014. Disponível em: <<http://www.webartigos.com/artigos/logistica-reversa-do-oleo-de-cozinha-usado/113547/>> Acesso em: 25/09/2023.

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, M.F.; SÉRGIO MIANA, FÁRIA. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. **New Phytologist**, v. 121, n. 4, p. 563-570, 1992.

MOURA, D.C.G.; OLIVEIRA, L.A. Capacidade de microrganismos autóctones de solos amazônicos em usar o petróleo como fonte de carbono com meios nutricionais distintos. **Diversidade Microbiana da Amazônia**, pgs. 218-224, 2017.

NORRIS, D. O. Acid production by *Rhizobium* a unifying concept. **Plant and Soil**, v. 22, p. 143-166, 1965.

NUNES, P.M.B *et al.* Waste soybean frying oil for the production, extraction, and characterization of cell-wall-associated lipases from *Yarrowia lipolytica*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, n. 4, p. 809-818, 2021.

OLIVEIRA et al. (Eds.) **Diversidade Microbiana da Amazônia**.1 ed. Manaus: Editora INPA, v.1, p. 185-191. 2016.

OLIVEIRA, F.R.; OLIVEIRA, L. A. Micro-organismos de solos amazônicos com habilidade em degradar gasolina obtida da Refinaria de Manaus (REMAN). In:

OLIVEIRA, L.A.; MAGALHÃES, H.P. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 203-208, 1999.

OLIVEIRA, T.C. *et al.* Crescimento de rizobactérias amazônicas em meio de cultura contendo farinha do mesocarpo do babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.) como fonte de nutrientes. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 12, n. 10, p. 109-118, 2021

PUBLIC HEALTH SERVICE. *In* Oil spills affecting the Minnesota and Mississippi rivers, winter 1962–1963, US Department of Health. **Education and Welfare**, p. 1–40, 1963.

USDA (UNITAD STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. OILSEEDS). **World Markets and Trade**. Set 2023. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>. Acesso em: 25/09/2023.

VINCENT, J.M. *et al.* A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.**, 1970.