

# **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BACTÉRIAS PARA DEGRADAR DERIVADOS DO PETRÓLEO E PRODUZIR BIOSURFACTANTES**

Evaluation of the bacteria potential for degrading petroleum derivatives and producing biosurfactants

Inês Maria Cals Theophilo Maciel<sup>1</sup>, Vânia Maria Maciel Melo<sup>2</sup>

## **RESUMO**

O presente trabalho descreve os resultados da avaliação de duas cepas de bactérias isoladas a partir de um efluente contaminado com óleo, para degradar derivados de petróleo e produzir biosurfactantes, preliminarmente identificadas como *Acinetobacter* spp. e *Bacillus* spp. A capacidade biodegradativa foi avaliada cultivando-as em meio mineral mínimo contendo glicerol, gasolina, querosene ou diesel como única fonte de carbono e energia. As duas bactérias degradaram o glicerol, a gasolina, o querosene e o diesel, e produziram biosurfactantes. De maneira geral as bactérias mostraram melhor e pior desempenhos na presença de glicerol e diesel, respectivamente. *Bacillus* spp. praticamente não cresceram e não produziram biosurfactantes quando cultivados em meio com diesel, sobrevivendo, contudo, na forma de esporos. A suplementação dessa cultura com extrato de levedura 0,04% promoveu crescimento e produção de biosurfactantes, atingindo um percentual de 95% de emulsificação. As bactérias mostraram-se susceptíveis ao calor, sendo destruídas sob uma temperatura de 46 °C, em 1 mg/L de hipoclorito de sódio e pH abaixo de 5.0, mas resistiram a 5% de NaCl, uma característica desejável para utilização dessas cepas em situações de biorremediação de ambientes marinhos contaminados com óleo.

**Palavras-chaves:** bactérias, *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp., degradação de petróleo, produção de biosurfactantes.

## **ABSTRACT**

The present research work describes the evaluation of the potential by two bacteria strains isolated from the oil polluted effluent, for degrading petroleum derivatives and producing biosurfactants, preliminarily identified as *Acinetobacter* spp. and *Bacillus* spp. Their biodegradation potential was assessed by their being cultivated in mineral broth containing glycerol, gasoline, kerosene or diesel as the only source of carbon and energy. Both bacteria degraded glycerol, gasoline, kerosene and diesel and produced biosurfactants. In general, the bacteria showed better and worse performances under the presence of glycerol and diesel, respectively. *Bacillus* spp., as a rule, did not grow and did not produce biosurfactant when cultivated in medium with diesel, surviving, however, under the spore form. The supplementation of that culture with 0.04 % of yeast extract, however, stimulated growth and production of biosurfactants production, reaching 95% of emulsification. Those bacteria were shown to be susceptible to heat, being destroyed at a 46°C temperature, at 1 mg/L of sodium hypochloride and pH below 5.0. On the other hand, they resisted to 5% NaCl, a desirable characteristic for use in marine bioremediation programs.

**Key words:** bacteria, *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp., oil degradation, biosurfactant production.

<sup>1</sup> Bióloga da Secretária de Educação do Ceará, Professora do Colégio Militar de Fortaleza.

<sup>2</sup> Professora Adjunto do Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza.

## INTRODUÇÃO

As atividades de prospecção e refinamento de petróleo envolvem alguns riscos ao ambiente e, não raro, têm ocorrido estragos provocados por derramamento de óleo em todo o mundo. Quando ocorrem derramamentos de petróleo nos oceanos forma-se uma camada impermeável que leva anos para ser eliminada e impede a oxigenação da água, matando a fauna e a flora marinhas, e alterando o ecossistema. O petróleo é constituído principalmente de hidrocarbonetos e minoritariamente por compostos heteroatômicos. Os hidrocarbonetos podem ser classificados de acordo com a relação carbono/hidrogênio de sua estrutura molecular em saturados (ou parafínicos ou alcanos), aromáticos e insaturados (Barathi & Vasudevan., 2001). Estima-se que seja despejado anualmente nos oceanos cerca de um milhão de toneladas de óleo apenas devido a vazamentos de poços, terminais portuários e limpeza dos tanques dos petroleiros.

Os microorganismos estão associados com o petróleo na sua formação, na recuperação de poços de perfuração, na sua decomposição e utilização (Tortora *et al.*, 2000). Atualmente, as soluções mais utilizadas para resolver problemas de derramamento de petróleo são a utilização de substâncias químicas sintéticas ou redes de contenção de óleo, mas estas, além da baixa eficiência, são de alto custo. Uma alternativa atraente é a biorremediação, que consiste na utilização de bactérias (ou de seus produtos) capazes de degradar o petróleo e/ou seus derivados com o auxílio de surfactantes, moléculas formadas por uma região hidrofílica e outra hidrofóbica, que agem reduzindo a tensão superficial e permitindo o uso de compostos imiscíveis em água pelas bactérias. Os biosurfactantes apresentam algumas vantagens sobre os surfactantes sintéticos destacando-se melhor atividade superficial, tolerância à temperatura, tolerância à força iônica, atividade emulsificante e biodegradabilidade (Nitschke & Pastore, 2002).

O Ceará vem-se destacando como um importante pólo petroquímico e essa atividade tem estimulado pesquisas em vários setores do conhecimento. Todavia, trabalhos sobre a biodiversidade microbiana nativa com potencial para degradar o petróleo ou seus resíduos são ainda insipientes. Nesse contexto, pretende-se contribuir para o registro de espécies microbianas nativas capazes de degradar petróleo e/ou produzir biosurfactantes, e avaliar suas potencialidades visando à seleção de espécies com potencial para serem utilizadas em atividades de biorremediação.

## MATERIAIS E MÉTODOS

As bactérias usadas neste trabalho foram isoladas a partir da água de descarga contaminada com óleo, de um navio petroleiro, na costa cearense. Amostras da água (pura e diluída em solução de NaCl 0,15 M) foram inoculadas em Caldo Nutritivo e incubadas à temperatura ambiente, por 48 horas. Após o crescimento, as culturas foram semeadas em placas de Agar Nutritivo para isolamento das colônias. As colônias que apresentaram características diferentes foram, então, semeadas de culturas puras, cujos isolados foram armazenados em Agar Nutritivo, em camada alta, sob óleo mineral, a 4 °C. Após alguns testes preliminares de biodegradação, as cepas 03 e 04 foram selecionadas para realização deste trabalho e foram cultivadas por 48 h a 37 °C para obtenção de colônias isoladas. A densidade das culturas foi medida em espectrofotômetro a 600 nm. Simultaneamente, procedeu-se à contagem de células viáveis dessas culturas pela técnica de *spread plate*, segundo APHA (1985), com os resultados expressos em unidades formadoras de colônia por ml (UFC/ml). Os inóculos das cepas 03 e 04 foram ajustados com Caldo Nutritivo esterilizado para uma densidade de  $10^7$  a  $10^8$  UFC/ml, correspondendo a uma absorbância de aproximadamente 0,1 a 600 nm.

O potencial das cepas 03 e 04 para degradar derivados do petróleo e produzir biosurfactantes foi avaliado cultivando-as em meio mineral mínimo contendo um hidrocarboneto como única fonte de carbono e energia, conforme Sar & Rosenberg (1983). Este meio foi esterilizado em autoclave a 121° C, por 15 min e, após resfriamento, foi adicionada uma solução de micronutrientes na proporção de 0,1% (v/v). Ao meio pronto foi adicionado, asepticamente, gasolina, glicerol, querosene ou diesel, para uma concentração final de 2% (v/v). As cepas foram inoculadas para uma concentração inicial de aproximadamente  $10^5$  a  $10^6$  UFC/ml. Nos tempos de inoculação 0, 6h, 24h, 48h, 72h, 96h e 168 h foram retiradas alíquotas das culturas para avaliação da biomassa, feita através de medidas de absorbância a 600 nm e contagens de células viáveis e atividade emulsificante. Para verificar a reprodutibilidade dos testes de biodegradação, foram feitos ensaios em Erlenmeyers de 50 ml contendo 10 ml de meio mineral com glicerol, querosene, gasolina ou diesel, a 2% (v/v).

A capacidade das cepas para produzir biosurfactantes foi avaliada através da emulsificação do querosene, de acordo com a metodologia de Iqbal *et al.* (1995), cujo percentual (E24) foi calculado dividindo-se a altura da camada emulsificada (mm) pela altura da camada total de líquido (mm), mul-

tiplicando-se por 100. Para facilitar a visualização das camadas foram acrescentados 200 µl de uma solução a 0,05% do corante Rosa Bengala, antes da agitação. Para extração dos biossurfactantes, essas culturas foram centrifugadas a 15.000 g, por 15 min, a 4°C para obtenção dos sobrenadantes das duas culturas, misturados com hexana na proporção de duas partes de sobrenadante para uma parte de solvente, e deixada em repouso por 24 h. Após esse tempo, a fase superior contendo o biossurfactante foi recuperada, lavada com água destilada, sob centrifugação a 15.000 g, por cinco minutos, a 4°C e, em seguida, liofilizada (Barathi & Vasudevan, 2001). Os biossurfactantes liofilizados produzidos pelas cepas 03 e 04, a partir do cultivo em presença de glicerol, foram analisados por espectroscopia infravermelha, através da técnica de disco prensado de KBr. A detecção de proteínas e as determinações de carboidratos foram feitas segundo as metodologias descritas por Bradford (1976) e Dubois *et al.* (1956).

**Pesquisa de oxidase:** a pesquisa da enzima citocromo oxidase foi feita seguindo as recomendações do fabricante do sistema Bactident oxidase (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os testes foram feitos com culturas de 24 h, crescidas em placas de Agar Nutritivo. No caso de germes citocromo oxidase (+), a zona de reação apresenta uma coloração azul-violeta. Como controles foram usadas bactérias oxidase positiva e negativa (Menezes e Silva, 1999).

**Pesquisa de catalase:** a prova da catalase foi feita emulsionando-se uma colônia de bactéria em uma gota de solução de NaCl 0,15 M, em uma lâmina de microscopia. Sobre essa suspensão adicionou-se uma gota de água oxigenada a 10 %. A formação imediata de bolhas de O<sub>2</sub> foi tomada como indicativo de prova positiva. Foram utilizadas bactérias catalase positiva e negativa como controles (Moura, 1986).

**Teste de indol, sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) e motilidade:** esse teste determina a habilidade de um microrganismo formar indol a partir do aminoácido triptofano. O microrganismo testado foi inoculado por picada central no meio SIM (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após incubação, adicionou-se o reativo de Kovac's comercial. Um teste positivo é caracterizado pela formação de um anel vermelho intenso na superfície do meio, e teste negativo, formação de um anel amarelo (Menezes e Silva, 1999). O teste do sulfeto de hidrogênio foi feito semeando-se o cultivo, por picada central no meio SIM, em camada alta. Os tubos foram incubados a 37°C, por 24 h, e o aparecimento de uma coloração negra foi indicativo de teste positivo (Menezes e Silva, *op. cit.*). O teste de motilidade foi feito por inóculo das bactérias, por picada central e única, em meio SIM. O meio foi incubado a 37°C, por 18-24 h. Um teste positivo apresenta crescimento difuso (além da linha de inoculação).

**Prova de citrato:** essa prova determina se um microrganismo é capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono. O cultivo puro foi semeado por estria central e na superfície do meio. O meio foi incubado a 37°C, por 24 h, e a positividade da prova foi dada a partir do crescimento, com mudança da cor do meio para azul intenso (Menezes e Silva, 1999).

**Teste de oxidação e fermentação:** este teste foi realizado em meio de Hugh and Leifson, pH 7,1. Uma solução de glucose foi adicionada para uma concentração final de 1% no meio. O meio foi distribuído em tubos até uma altura de aproximadamente 5 cm da superfície, incubados em estufa por 24 h a 37°C. A interpretação do teste é feita a partir da coloração dos meios. Culturas de metabolismo oxidativo e fermentativo foram usadas como controles. Após a caracterização bioquímica, as cepas 03 e 04 foram submetidas às seguintes provas fisiológicas: temperatura, pH, pressão osmótica e suscetibilidade ao cloro, realizadas seguindo a metodologia descrita por Machado, 2002.

**Temperatura:** colônias de 24 h dos isolados 03 e 04 foram inoculadas em Caldo Nutritivo e incubadas em banho de água, termostaticamente regulado a temperaturas de 37, 40, 42, 44, 46 e 47°C, por 24 h. A confirmação de crescimento foi feita observando-se a turvação do meio.

**pH:** o efeito do pH foi avaliado em Caldo Nutritivo previamente ajustado nos pH 4,0; 5,0; 7,0 (controle); 9,0 e 11,0. Uma colônia da bactéria foi inoculada em 5 ml do meio. Os tubos foram incubados em estufa a 37°C, por 24 horas, para observação da turvação. Os ensaios foram feitos em triplicata.

**Pressão osmótica:** O efeito da pressão osmótica sobre o crescimento das bactérias foi testado cultivando-as em Caldo Nutritivo acrescido de NaCl nas seguintes concentrações: 0,85% (controle), 3,5%; 5,0%; 7,0% e 10,0%. Uma colônia da bactéria crescida, foi inoculada em 5 ml do meio. Os tubos foram, então, incubados a 37°C, por 24 h, para observação do crescimento, através da turvação.

**Suscetibilidade ao cloro:** foram preparadas soluções de hipoclorito de sódio, em água destilada estéril, nas concentrações 0,1, 1,0 e 10,0 mg/L. Uma colônia da bactéria, foi inoculada nos tubos contendo as soluções de hipoclorito de sódio e, após 10, 20 e 30 min, foram feitos subcultivos, semeando-se uma alçada da suspensão em meio de Agar Nutritivo em placas de Petri, incubadas a 37°C, por 24 h, para observação do crescimento. Cada concentração de hipoclorito de sódio foi testada em triplicata e, como controles, as cepas 03 e 04 foram tratados da mesma forma em meio sem hipoclorito de sódio.

## RESULTADOS

Este trabalho apresenta os resultados da biodegradação de derivados do petróleo por duas cepas de bactérias isoladas a partir de água de descarga contaminada com óleo, de um navio petroleiro, na costa cearense.

Como se observa na Figura 1, a curva de crescimento da cepa 03, em meio mineral contendo glicerol como única fonte de carbono, elaborada a partir das medidas de absorvância e contagens de células viáveis, por um período de 96 h., mostra uma fase de latência de aproximadamente 6 h. A partir daí, a bactéria entrou em fase exponencial de crescimento, atingindo o máximo de produção de biomassa viável com 48 h, seguida da fase de declínio.

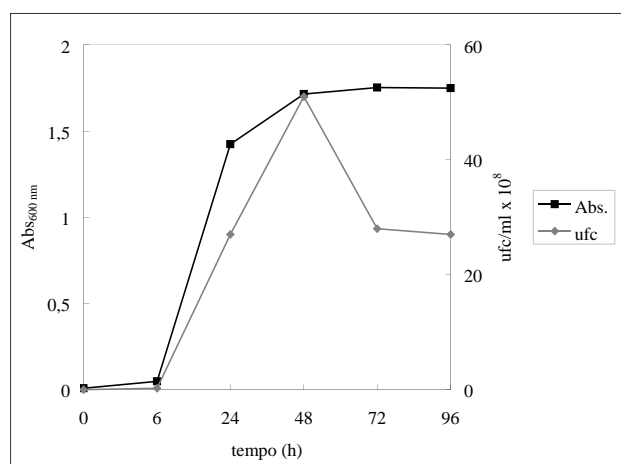


Figura 1 – Curva de crescimento da cepa 03 na presença de glicerol a 2 % (v/v).

As medidas de absorvância, refletindo uma estimativa da população total, aumentaram progressivamente até o final da fase exponencial, permanecendo constantes até o final do experimento. A cepa 04 também foi capaz de degradar o glicerol e, como para a cepa 03, até 6 horas de cultivo não se observou aumento significativo do número de células, com o pico de crescimento acontecendo com 48 h (Figura 2). Estas cepas degradaram o glicerol com o auxílio de biossurfactantes, como constatado inicialmente pela presença excessiva de espuma nas culturas (Figura 3). Através de ensaios da atividade emulsificante detectou-se a presença de biossurfactantes com 24 h de cultivo, sendo o pico de produção atingido com 48 h (E24 = 50%), para ambas as culturas, observando-se um declínio com 72 h (Figura 4). O glicerol, a gasolina e o querosene, foram metabolizados mais cedo, com uma atividade emulsificante significativa a partir de 24 h (E24 30 a 46%). Inicialmente, a cepa 03 não se mostrou tão eficiente para produzir biossurfac-

tante na presença de diesel, como revelado pelo baixo percentual de emulsificação, E24 10%. Entretanto, observou-se um pico de produção do emulsificante com 48 h, para todos os substratos, observando-se uma tendência para a manutenção ou diminuição desta atividade com 168 h (Figura 5).

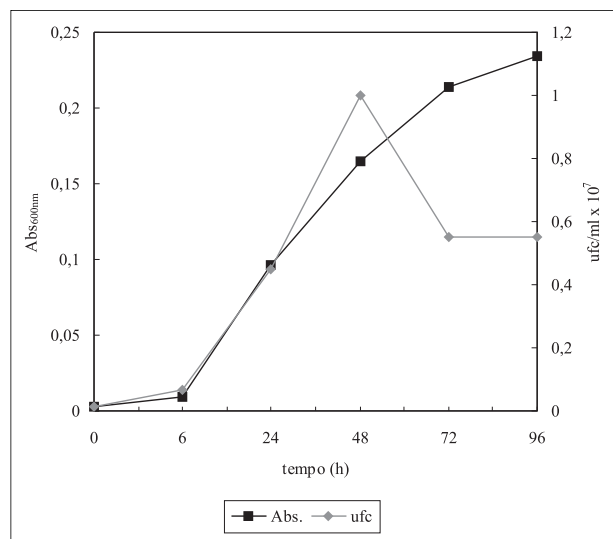


Figura 2 – Curva de crescimento da cepa 04 na presença de glicerol a 2% (v/v).



Figura 3 – Aspecto da cultura da cepa 03, produzindo biossurfactante em meio mineral com glicerol a 2% (v/v).

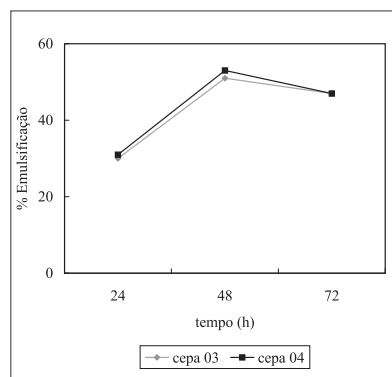


Figura 4 – Emulsificação de querosene pelos biossurfactantes produzidos pelas cepas 03 e 04.

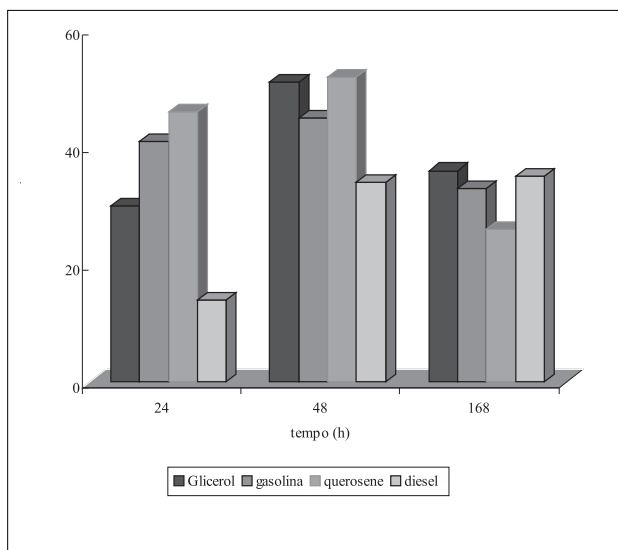


Figura 5 – Biodegradação de glicerol, gasolina, querosene e diesel, na concentração de 2% (v/v), pela cepa 03.

O desempenho da cepa 04 frente aos quatro derivados do petróleo testados, Figura 7, mostra uma semelhança com a cepa 03: com 24 h, foi detectada atividade emulsificante na presença de gasolina, querosene e glicerol. Com 48 h, ocorreu um aumento da atividade emulsificante na presença de glicerol, enquanto para gasolina e querosene observou-se uma diminuição do E24. Com 168 h, observou-se uma tendência para diminuição do E24 para todos os hidrocarbonetos testados (Figura 6).

Nas primeiras 24 h de cultivo da cepa 04 com diesel, houve um aumento no número de células viáveis, de  $0,5 \times 10^5$  ufc/ml para  $2 \times 10^5$  ufc/ml. Esse número permaneceu constante até 48 h, caindo drasticamente para  $0,02 \times 10^5$  ufc/ml com 72 h. As medidas concomitantes do E24 foram negativas. Além disso, a produção de esporos foi confirmada através da observação de lâminas coradas (Figura 7).

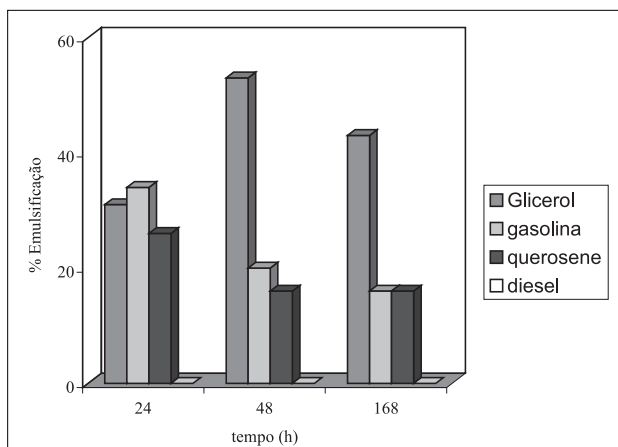


Figura 6 – Biodegradação de glicerol, gasolina, querosene e diesel, na concentração de 2% (v/v), pela cepa 04.

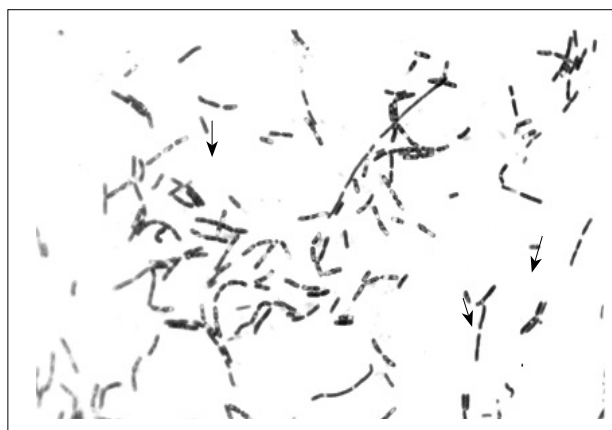


Figura 7 – Cepa 04 – bacilo Gram-positivo. Setas destacando células esporuladas.

Na tentativa de reverter o estado fisiológico das células esporuladas, adicionou-se, asepticamente, à cultura uma solução 0,04% de extrato de levedura, continuando-se o monitoramento a partir daí. Após 24 h, já se detectou um aumento significativo no número de células viáveis ( $3 \times 10^5$  ufc/ml), sendo, também, detectada atividade emulsificante (E24 75%). Com 48 h registrou-se um aumento na densidade celular e uma excelente atividade emulsificante, com um E24 95%, nas condições atuais da cultura, ou seja, suplementada com extrato de levedura. Esse percentual de atividade emulsificante manteve-se constante até 66 h de cultivo (Figura 8).

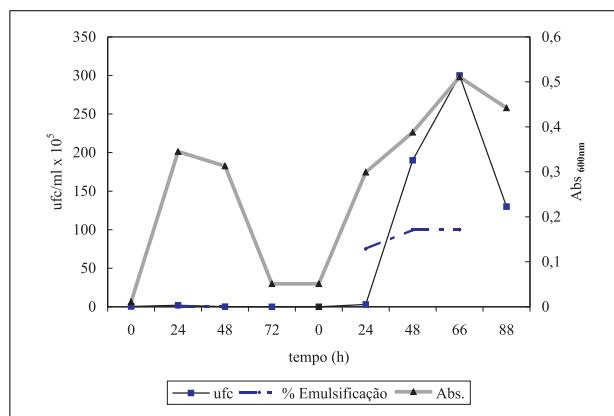


Figura 8 – Biodegradação de diesel pela cepa 04 em meio mineral enriquecido com extrato de levedura 0,04% após 72 h de cultivo.

Os biossurfactantes produzidos pelas cepas 03 e 04 foram extraídos, ao final do cultivo na presença de glicerol, e analisados por espectroscopia infravermelha. Os espectros dos biossurfactantes produzidos pelas duas cepas (Figuras 9 e 10) revelaram a presença de grupos funcionais característicos das classes dos lipossacarídeos e polipeptídios, para os biossurfactantes produzidos pelas cepas 03 e 04, respectivamente (Tabela I). Essas análises foram

valiosas e irão auxiliar na identificação definitiva da estrutura química dessas substâncias.

Tabela I – Modos vibracionais de grupamentos químicos dos biossurfactantes produzidos pelas cepas 03, 04.

Atributos	Cepa 03	Cepa 04
NI		1123
NI	1153	1160
C-O est <sup>1</sup> .	1067	1060
C-O est. Éster	1242	1248
NI	1290	
NI	1310	1315
CH <sub>3</sub> est. sim <sup>2</sup> .	1385	1385
NI		1426
NI	1403	
NI		
CH <sub>3</sub> est. assim <sup>3</sup> .	1452	1457
CN est. NH dob <sup>4</sup> .	1540	1550
NI		1620
NI		1638
C=O est. amida	1650	
C=O est. ester	1736	1736
CH <sub>2</sub> est. sim.	2855	2858
CH <sub>3</sub> est. sim.	2875	2878
CH <sub>2</sub> est. assim.	2925	2927
CH <sub>3</sub> est. assim.	2959	2961
NI		3240
NI	3080	
NI	3300	
OH ou NH	3415	3415
OH ou NH	3473	3473
OH ou NH	3544	3550

<sup>1</sup>est.=estiramento

<sup>2</sup>est. sim= estiramento simétrico

<sup>3</sup> est. assim.= estiramento assimétrico

<sup>4</sup>dob. = dobramento

A pesquisa de carboidratos nos sobrenadantes das culturas 03 e 04 revelou a presença de açúcares redutores em concentração bastante significativa no sobrenadante da cultura com glicerol (Figura 11), reforçando os resultados de espectroscopia infravermelha, que sugerem uma estrutura lipossacarídica para esse biossurfactante.

Na Figura 12 é mostrada a produção de carboidratos pela cepa 04, detectando-se uma maior concentração de açúcares redutores para o sobrenadante obtido a partir da cultura com glicerol. Todavia, percebe-se claramente que a cepa 03 produziu aproximadamente três vezes mais carboidratos do que a cepa 04. De maneira geral, detectou-se proteína nos sobrenadantes obtidos a partir das culturas 03 e 04, cultivadas em meio mineral contendo glicerol, gasolina, querosene ou diesel. Novamente, eram os sobrenadantes provenientes das culturas com glicerol que continham, comparativamente, mais proteínas (Figuras 13 e 14).

Os resultados da análise de proteínas no sobrenadante proveniente do cultivo da cepa 04, em

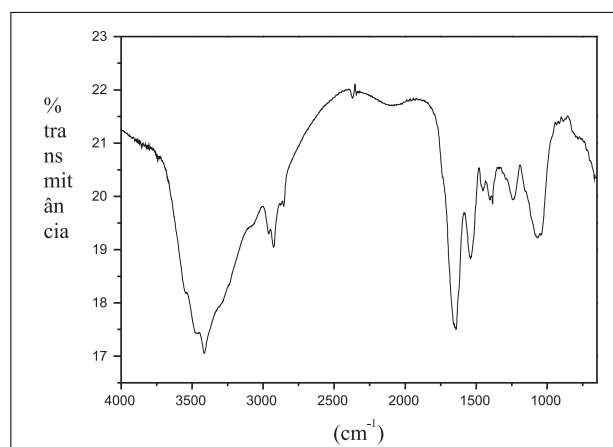


Figura 9 – Espectro infravermelho do biossurfactante produzido pela bactéria 03 cultivada em presença de glicerol, no intervalo de 4000 a 650 cm<sup>-1</sup>.

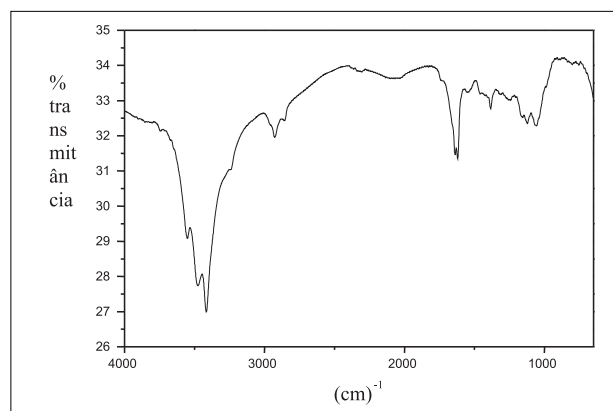


Figura 10 – Espectro infravermelho do biossurfactante produzido pela bactéria 04 cultivada em presença de glicerol no intervalo de 1000 a 650 cm<sup>-1</sup>.

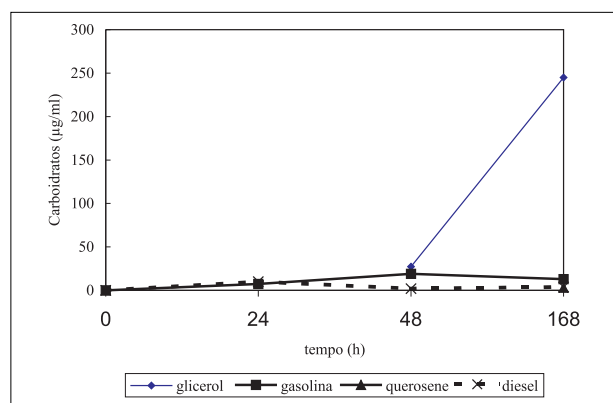


Figura 11 – Concentração de carboidratos nos sobrenadantes obtidos a partir do cultivo da cepa 03 em meio mineral contendo glicerol, gasolina, querosene ou diesel, 2% (v/v).

glicerol, reforçam os dados de infravermelho, que sugerem uma natureza polipeptídica para esse biossurfactante. Várias espécies de *Bacillus* produzem biossurfactantes lipopeptídicos, com destaque para a surfactina, composto de uma cauda de ácidos graxos



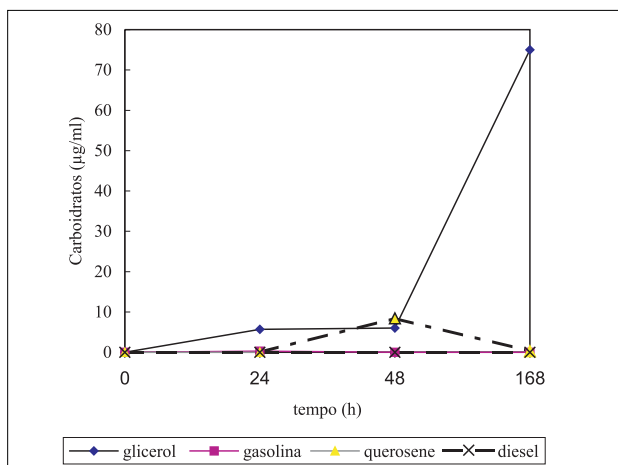


Figura 12 – Concentração de carboidratos nos sobrenadantes obtidos a partir do cultivo da cepa 04 em meio mineral contendo glicerol, gasolina, querosene ou diesel, 2% (v/v).

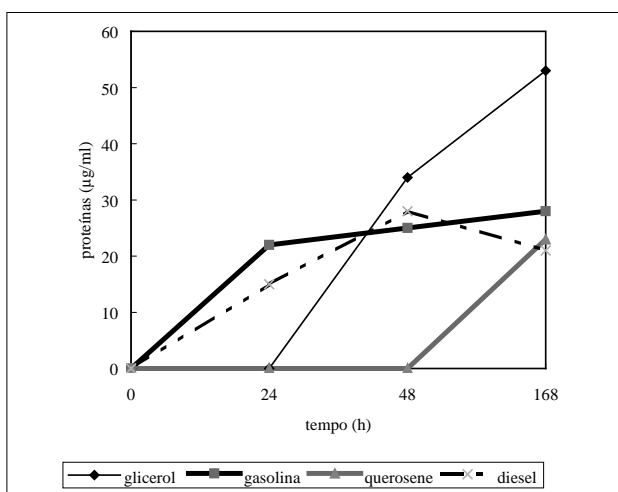


Figura 13 – Concentração de proteínas solúveis nos sobrenadantes obtidos a partir do cultivo da cepa 03 em meio mineral contendo glicerol, gasolina, querosene ou diesel, 2% (v/v).

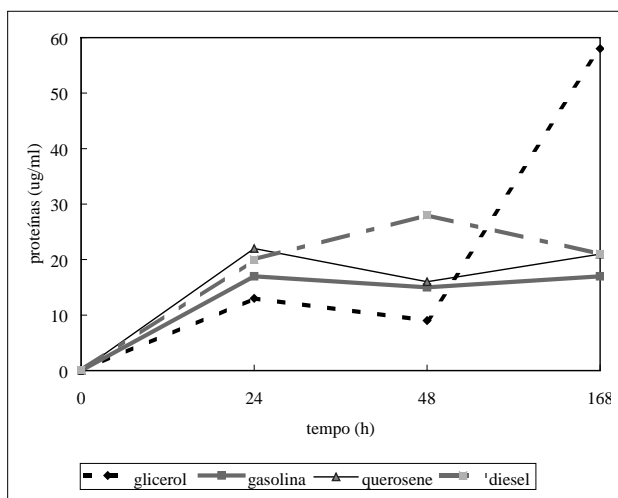


Figura 14 – Concentração de proteínas solúveis nos sobrenadantes obtidos a partir do cultivo da cepa 04 em meio mineral contendo glicerol, gasolina, querosene ou diesel, 2% (v/v).

e uma cabeça peptídica, estrutura típica das moléculas anfipáticas que apresentam propriedades emulsificantes (Neu *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1997).

Comparando-se as características morfológicas, culturais, bioquímicas e fisiológicas da cepa 03 com essas mesmas características de cepas de *Acinetobacter calcoaceticus*, já patenteadas e produtoras de biossurfactantes (Tabela II), observa-se várias semelhanças. Analisando o conjunto das características morfológicas e culturais é possível afirmar que a cepa 03 apresenta características idênticas à cepa 217. Embora a maioria das características culturais da cepa RAG-1 não esteja disponível, o padrão incolor de suas colônias a distingue da cepa 03, que produz colônias de cor creme. De forma semelhante, a cepa 03 difere da cepa ER-96 com relação à forma da célula, cocobacilo e cocóide, respectivamente. Analisando os perfis bioquímicos das cepas 03, 217, ER-96 e RAG-1 (Tabela II), verifica-se novamente uma marcada semelhança entre as cepas 03 e 217. Com exceção do resultado negativo da cepa 03 para o teste de H<sub>2</sub>S, as duas cepas mostram resultados idênticos para as outras provas bioquímicas.

Comparando-se os parâmetros bioquímicos, é possível constatar que a bactéria *A. calcoaceticus* apresenta linhagens bioquímicas diferentes, que, provavelmente, evoluíram a partir de variações genéticas adaptativas. As cepas 03 e 217 também se assemelham em algumas características fisiológicas, já que ambas praticamente crescem na mesma faixa de pH e suportam até 5% de NaCl. Com relação à temperatura, a cepa 03 é mais resistente, já que cresce até 46 °C, enquanto a cepa 217 só cresce até 37 °C. A cepa RAG-1 se diferencia das cepas 03 e 217 por crescer em até 10% de NaCl. Ao contrário da cepa 03, algumas características da cepa 04 já permitem a sua inclusão no gênero *Bacillus*, destacando-se o fato de ser um bacilo Gram-positivo, produtor de esporos e anaeróbico facultativo (Tabela III).

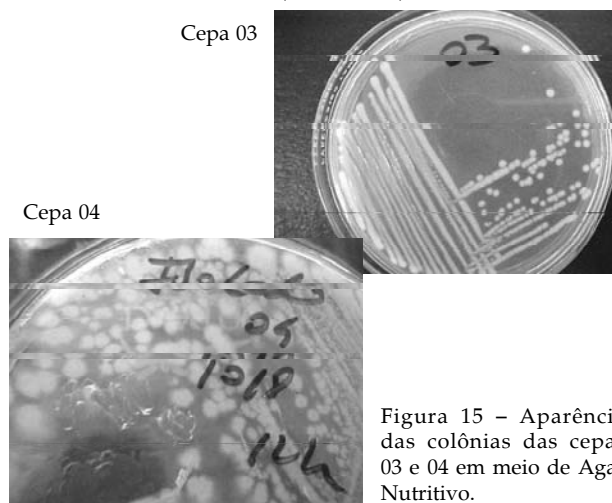


Figura 15 – Aparência das colônias das cepas 03 e 04 em meio de Agar Nutritivo.

Tabela 2 – Características morfológicas, culturais, bioquímicas e fisiológicas das cepas 03 e de cepas patenteadas de *Acinetobacter calcoaceticus*, produtoras de biossurfactantes.

Características	Cepa 03	217 <sup>1</sup>	ER-96 <sup>2</sup>	RAG-1 <sup>3</sup>
<b>Morfológicas</b>				
Forma	Cocobacilo	Cocobacilo	Cocóide em fase estacionária	Cocobacilo
Arranjo	Sem arranjo	Sem arranjo	Sem arranjo	Sem arranjo
Esporos	Não	Não	Não	Não
Gram	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
Motilidade	Imóvel	Imóvel	Imóvel	Imóvel
<b>Culturais</b>				
Tamanho da colônia	2-3 mm	-*	-	-
Forma	Circular	Circular	circular	-
Elevação	Convexa	Convexa	Convexa	-
Bordos	Inteiro	Inteiro	Inteiro	-
Superfície	Lisa	Lisa	Lisa	-
Cromogênese	Creme	Creme	Incolor	incolor
<b>Bioquímicas</b>				
Oxidase	Negativo	Negativo	Negativo	Positiva
Catalase	Positivo	Positivo	Positivo	-
O/F	Fermentativo	Fermentativo	Oxidativa	-
Citrato	Positivo	Positivo	Positivo	-
H <sub>2</sub> S	Negativo	Positivo	-	-
Indol	Positivo	Positivo	Negativo	-
<b>Fisiológicas</b>				
Temperatura	25-46 °C	20-37 °C	-	26-40 °C
pH	5-9	6-9,6	-	7-10,0
Concentração de NaCl suportada	5%	< 5%	-	10%
Concentração máxima de cloro suportada	1 mg/L, 10 min	-	-	-

<sup>1</sup> *A. calcoaceticus* 217 (European Patent Office 0 401 700 A2).

<sup>2</sup> *A. calcoaceticus* ER-96 (European Patent Office 0 924 221 A2).

<sup>3</sup> *A. calcoaceticus* RAG-1(ATCC 31012).

\* não disponível.



Tabela 3 – Características morfológicas, culturais, bioquímicas e fisiológicas da cepa 04.

Características	Cepa 04
<b>Morfológicas</b>	
Forma	Bacilo
Arranjo	Sem arranjo
Esporos	Sim
Gram	Positiva
Motilidade	Móvel
<b>Culturais</b>	
Tamanho da colônia	10 mm
Forma	Irregular
Elevação	Plana
Bordos	Irregular
Superfície	Lisa
Cromogênese	Branca
<b>Bioquímicas</b>	
Oxidase	Positivo
Catalase	Positivo
O/F	Fermentativo
Citrato	Negativo
H <sub>2</sub> S	Negativo
Indol	Negativo
<b>Fisiológicas</b>	
Temperatura máxima suportada	46 °C
Crescimento neste faixa de pH	5-9
Concentração máxima de NaCl suportada	5%
Concentração máxima de cloro suportada	1 mg/L, 30 min

## DISCUSSÃO

A cepa 03 em meio mineral contendo glicerol, tinha uma cultura com densidade inicial de cerca de  $10^5$  UFC/ml. Como essa densidade encontrava-se na ordem de  $10^9$  UFC/ml ao final da fase exponencial, conclui-se que a bactéria degradou o glicerol, já que era única fonte de carbono no meio. Tendo em vista que, ao final da fase exponencial, a densidade celular da cultura 04 era da ordem de  $10^7$  UFC/ml, fica claro que essa cepa foi menos eficiente em degradar o glicerol do que a cepa 03, nas mesmas condições. Várias bactérias, incluindo espécies de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Bacillus*, são capazes de degradar vários derivados do petróleo, com significativa produção de biossurfactantes, também a partir de 24 h de cultivo, (Marin *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1997; Barathi & Vasudevan, 2001; Morán *et al.*, 2002).

Comparando-se o percentual de emulsificação (50%) do querosene pelas cepas 03 e 04, com o percentual de emulsificação (50-60%) desse mesmo subs-

trato pela *Acinetobacter calcoaceticus*, uma bactéria reconhecidamente produtora de biossurfactante (Sar & Rosenberg, 1983; Bicca *et al.*, 1999), verifica-se que essas cepas nativas apresentam um bom desempenho para esta atividade, com grandes perspectivas de utilização industrial. Embora, atualmente, os surfactantes sintéticos ainda sejam os mais utilizados na indústria de petróleo, o biossurfactante Emulsan, produzido pela cepa de *Acinetobacter* RAG-1, já é utilizado industrialmente na limpeza de tanques de armazenamento de óleo (<http://eqs.nrl.navy.mil/demval.html>).

A conclusão de que a cepa 03 degradou os hidrocarbonetos glicerol, gasolina, querosene e diesel pode ser inferida a partir dos resultados de sua atividade emulsificante. Geralmente, as bactérias degradadoras de petróleo produzem maior quantidade de biossurfactantes ao final da fase exponencial, quando há maior produção de células, sugerindo a existência de correlação entre biomassa celular e produção de emulsificante (Sar & Rosenberg, 1983; Kim *et al.*, 1997). A diminuição da atividade emulsificante

te, observada com 168 h poderia ser explicada pelo consumo dos biosurfactantes produzidos. Considerando que muitos desses compostos são proteínas, carboidratos, lipídios ou misturas desses compostos, é possível especular que em uma situação de estresse, a bactéria recorra a esta fonte de matéria orgânica para sua sobrevivência. Uma outra explicação plausível seria a neutralização da atividade emulsificante como consequência de reações químicas entre metabólitos gerados em um sistema fechado.

Segundo os resultados obtidos, pode-se afirmar que a cepa 04 não degradou o diesel e, se o fez, não foi com o auxílio de emulsificantes. Quando os biosurfactantes são extracelulares causam emulsificação do hidrocarboneto, ou seja, estão envolvidos nos processos de adesão celular, emulsificação e dispersão. Quando estão associados à parede celular facilitam a penetração dos hidrocarbonetos no interior da célula. Esses últimos fazem a degradação do hidrocarboneto intracelularmente (Cirigliano & Carman, 1984; Fiechter, 1992).

O comportamento da cepa 04 na presença de diesel pode ser entendido através do fato de que esta é um bacilo Gram-positivo, produtor de esporo, de modo que a ausência de atividade emulsificante frente ao diesel poderia ser explicada pela esporulação da bactéria, que não realiza atividade metabólica, mas também não está morta (Tortora *et al.*, 2000). O comportamento da cepa 04, na presença de diesel, reforça a necessidade da padronização das condições de cultivo em estudos de biodegradação, como já reportado por outros autores. Por exemplo, várias bactérias degradadoras de petróleo apresentam exigências nutricionais para esta atividade bioquímica. Provavelmente, a suplementação com extrato de levedura, uma fonte de vitaminas do complexo B, forneça algum cofator necessário para atividade de enzimas associadas a biodegradação de hidrocarbonetos. Além do extrato de levedura, também, são utilizados glucose, sacarose ou até mesmo, extratos vegetais para enriquecimento do meio mineral.

As bactérias degradadoras de petróleo demonstram maior facilidade para degradar n-alcenos lineares, seguido de alcenos ramificados e, por fim, compostos aromáticos de alta massa molecular, que são de difícil degradação (Atlas & Bartha, 1992). Os resultados deste trabalho mostraram que as cepas 03 e 04 metabolizaram mais facilmente o glicerol, um hidrocarboneto de três átomos de carbono, pois ocorre uma relação entre o tamanho da cadeia do hidrocarboneto e a dificuldade de biodegradação. Tem sido reportado que a composição heterogênea de diferentes óleos brutos e refinados influencia sua biodegradabilidade (Leahy & Colwell, 1990). Finalmente, os diferentes organismos podem metabolizar somente

um número limitado de substratos hidrocarbonetos (Marin *et al.*, 1996). Com base nas características culturais, bioquímicas e fisiológicas, e com o auxílio de chaves analíticas do Bergey (Krieg & Holt, 1984), as cepas 03 e 04 foram preliminarmente identificadas como *Acinetobacter* spp. e *Bacillus* spp.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Apha. *Standard methods for the examination of dairy products*. American Public Health Association, 14<sup>th</sup> edition, 410 p., Washington, 1985.
- Atlas, R.M. & Bartha, R. Microbial Ecology: *Pseudomonas*. *Biodegradation*, v.5, p. 195-217, 1992.
- Banat, I.M. Characterization of biosurfactant and their use in pollution removal: state of the art (review). *Acta Biotechnology*, n.15, p.251-267, 1995b.
- Barathi, A. & Vasudevan, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Rev. Environ. Inter.*, v. 26, p. 413-416, 2001.
- Bicca, F.C.; Fleck, C.L. & Ayub, M.A.Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *R. erythropolis*. *Microbiol Rev.*, v.30, p. 231-236, 1999.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.*, v.72, p. 248-254, 1976.
- Cirigliano, M.C. & Carman, G.M. Isolation of bioemulsifier form of *Candida lipolyt*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.48, p. 747-75, 1984.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Roberts, P.A. & Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Ann. Biochem.*, v.28, p.350-356, 1956.
- Fiechter, A. Biosurfactants: moving towards industrial applications. *Trends Biotechnology*, v.10, p.208-217, 1992.
- Iqbal, S.; Khalid, Z.M & Malik, K.A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactant by gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Lett. App. Microbiol.*, v.21, p. 176-179, 1995.
- Kim, H.S.; Yoom, B.D.; Lee, C.; Suh, H.; Oh, H.M.; Katsuragi, T. & Tani, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis*. *J. Ferment. Bioengin.*, v. 84, 1997.
- Krieg, N.R. & Holt, J.G. (eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1984.

- Leahy, J.G. & Colwell, R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment *Microbiol. Rev.*, n.54, p. 305-313, 1990.
- Marin, M., Pedregosa, A., Rios, S., Ortiz, M.L., Labor-da, F. *Biodegradation of diesel and heating oil by Acinetobacter calcoaceticus MM5: its possible applications on bioremediation*. International Biodeterioration & Biodegradation, p. 269-285, 1995.
- Menezes e Silva, C.H.P. *Bacteriologia: um texto ilustrado*. Eventos Editora, 531 p., Rio de Janeiro, 1999.
- Morán, A.C.; Martinez, M.A. & Siñeiz, F. Quantification of surfactin in culture supernatants by hemolytic activity. *Biotech. Lett.*, v.24, p.177-180, 2002.
- Moura, R.A. *Microbiologia clínica*. Mc Will Editora, 185 p., São Paulo, 1986.
- Neu, T.R. & Poralla, K. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, v. 32 n.5, p.151-525, 1990 .
- Nitschke, M. & Pastore, G.M. *Biossurfactantes: propriedades e aplicações*, v.25, 2002.
- Sar, N. & Rosenberg, E. *Emulsion Production by Acinetobacter calcoaceticus*, 1983.
- Tortora, G.J.; Funke, B.R. & Case, C.L. *Microbiologia*. Artes Gráficas, 6ª edição, 827 p., Porto Alegre, 2000.