



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
MESTRADO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BACTÉRIAS PARA DEGRADAR
-
DERIVADOS DO PETRÓLEO E PRODUZIR BIOSSURFACTANTES**

INÊS MARIA CALS THEOPHILO MACIEL

Fortaleza-CE

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
MESTRADO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

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

INÊS MARIA CALS THEOPHILO MACIEL

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS, COMO REQUISITO PARA
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Fortaleza - 2003

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

INÊS MARIA CALS THEOPHILO MACIEL

Dra. Vânia Maria Maciel Melo
Depto. de Biologia
Universidade Federal do Ceará
Orientadora

“Nunca ande pelo caminho traçado,
pois ele conduz somente até onde os outros foram.”

Graham Bell

A Deus
Aos meus filhos,
Renata, Paula e Daniel
Aos meus pais,
Manoel Theophilo G. de Oliveira Neto
Maria de Lourdes Cals Theophilo G. de Oliveira

Dedico com carinho

AGRADECIMENTOS

Especialmente à Dra. Vânia Maria Maciel Melo, que me reiniciou no caminho da pesquisa, acreditando no meu trabalho e me incentivando com seu exemplo de profissional competente e dedicada ao trabalho e especialmente à pesquisa. Todo esse tempo de convívio para a realização do trabalho de pesquisa foi de grande importância para o meu crescimento profissional.

Aos profissionais do Labomar e em especial à Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira, por sua disponibilidade em orientar meu primeiro trabalho e ao professor Antônio Aduino Fonteles Filho, pela colaboração e disponibilidade.

À professora Suzana Cláudia Silveira Martins, por sua constante ajuda, tirando dúvidas, contribuindo com o andamento da pesquisa e disponibilizando seu tempo e sua amizade durante todo o período da pesquisa.

Ao Dr. Francisco Erivan de Abreu Melo, do Departamento de Física da UFC, pela colaboração nas análises de infravermelho.

Ao físico Pedro de Freitas Façanha Filho, pelas análises de infravermelho dos biossurfactantes.

Ao PADETEC, na pessoa do Dr. Afrânio Aragão Craveiro, por permitir a realização das análises de infravermelho.

Aos bolsistas e monitores do Laboratório de Microbiologia: Luciana, Vanessa, Gardênia, Fernanda, Sara, Rafaela, Vladimir e à funcionária Rivalda, sempre dispostos a ajudar em todos os momentos com simpatia e boa vontade.

Especialmente aos meus filhos, pela paciência nos longos períodos de ausência, que souberam compreender com carinho e amor.

Aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado, em todos os momentos mais difíceis e me deram força, acreditando na minha capacidade de vencer obstáculos.

A todos os meus irmãos que de forma direta ou indireta, contribuíram para que eu concluísse o trabalho.

A todos os amigos, em especial Hilda e Ariel, que além da amizade e carinho, também colaboram na formatação do trabalho.

Ao Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios foi executado todo o trabalho.

À Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP), pela bolsa concedida.

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL	3
2.1 – Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
4. MATERIAIS E MÉTODOS	7
4.1 - Isolamento, crescimento e identificação parcial de bactérias	7
4.2 – Preparação do meio mineral e padronização de inóculo	7
4.3 – Biodegradação de derivados do petróleo	8
4.4 – Atividade Emulsificante	9
4.5 – Extração e caracterização dos biossurfactantes	10
4.5.1 – <u>Espectroscopia infravermelho</u>	10
4.5.2 – <u>Determinação de proteína solúvel</u>	10
4.5.3 – <u>Determinação de carboidratos</u>	11
4.6 – Caracterização bioquímica das cepas produtoras de biossurfactantes	11
4.6.1 – <u>Pesquisa de oxidase</u>	11
4.6.2 – <u>Pesquisa de catalase</u>	11
4.6.3 - <u>Teste de Indol, Sulfeto de hidrogênio (H₂S) e Motilidade</u>	12
4.6.4 – <u>Prova de citrato</u>	12
4.6.5 – <u>Teste de O/F (Oxidação e fermentação)</u>	13
4.7 – Caracterização fisiológica	13
4.7.1 – <u>Temperatura</u>	13
4.7.2 – <u>Ph</u>	14
4.7.3 – <u>Pressão osmótica</u>	14

4.7.4 – <u>Suscetibilidade ao cloro</u>	14
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
6. CONCLUSÕES	36
7. BIBLIOGRAFIA	37

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Visualização da altura da camada emulsificada (seta).	09
FIGURA 2 – Curva de crescimento da cepa 03 na presença de glicerol 2% (v/v).	16
FIGURA 3 – Curva de crescimento da cepa 04 na presença de glicerol a 2% (v/v).	17
FIGURA 4 – Aspecto da cultura da cepa 03 produzindo biossurfactante em meio mineral com glicerol a 2% (v/v).	18
FIGURA 5 – Emulsificação de querosene pelos biossurfactantes produzidos pelas cepas 03 e 04.	19
FIGURA 6 – Biodegradação de glicerol, gasolina, querosene e diesel, na concentração de 2% (v/v) pela cepa 03.	20
FIGURA 7 – Biodegradação de glicerol, gasolina, querosene e diesel, na concentração de 2% (v/v) pela cepa 04.	22
FIGURA 8 – Cepa 04 – bacilo Gram-positivo. Setas destacando células esporuladas.	23
FIGURA 9 – Biodegradação de diesel pela cepa 04 em meio mineral enriquecido com extrato de levedura 0,04% após 72 h de cultivo.	24
FIGURA 10 - Espectro infravermelho do biossurfactante produzido pela bactéria 03 no intervalo de 4000 a 650 cm^{-1}	25
FIGURA 11 - Espectro infravermelho do biossurfactante produzido pela bactéria 04 no intervalo de 4000 a 650 cm^{-1}	26
FIGURA 12 – Concentração de carboidratos nos sobrenadantes obtidos a partir do cultivo da cepa 03 em meio mineral contendo glicerol, gasolina, querosene e diesel, 2% (v/v).	28
FIGURA 13 – Concentração de carboidratos nos sobrenadantes obtidos a partir do cultivo da cepa 04 em meio mineral contendo glicerol, gasolina, querosene e diesel, 2% (v/v).	29
FIGURA 14 – Concentração de proteínas solúveis nos sobrenadantes obtidos a partir do cultivo da cepa 03 em meio mineral contendo glicerol, gasolina, querosene e diesel, 2% (v/v).	30

FIGURA 15 – Concentração de proteínas solúveis nos sobrenadantes obtidos a partir do cultivo da cepa 04 em meio mineral contendo glicerol, gasolina, querosene e diesel, 2% (v/v).	31
FIGURA 16 – Aparência das colônias das cepas 03 e 04 em meio de Agar Nutritivo.	32
FIGURA 17 – Resposta tintorial das cepas 03 (Gram-negativa, foto superior) e cepa 04 (Gram-positiva, foto inferior) à coloração pelo Gram.	32

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Modos vibracionais de grupamentos químicos dos biossurfactantes produzidos pelas cepas 03, 04 cultivadas em presença de glicerol.	27
TABELA 2 – Características morfológicas, culturais, bioquímicas e fisiológicas das cepas 03 e de cepas patenteadas de <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , produtoras de biossurfactantes.	33
TABELA 3 – Características morfológicas, culturais, bioquímicas e fisiológicas das cepas 04.	34

ABREVIATURAS

Abs.	Absorbância
BSA	Albumina Sérica Bovina
E24	Percentual de emulsificação, calculado após 24 horas
Nm	Nanômetro
P.A.	Para Análise
ufc	Unidades formadoras de colônias
µl	Microlitros
mg	Miligrama
pH	Potencial de hidrogênio
v/v	Volume/volume
PADETEC	Parque de Desenvolvimento Tecnológico da UFC
rpm	Rotações por minuto

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 do petróleo e produzir biossurfactantes. Através de estudos de suas características morfológicas, culturais, bioquímicas e fisiológicas, as bactérias selecionadas, nomeadas preliminarmente cepa 03 e cepa 04, foram identificadas como *Acinetobacter* spp. e *Bacillus* spp., respectivamente. A capacidade biodegradativa dessas bactérias foi avaliada cultivando-as em meio mineral mínimo, contendo, sempre, um dos hidrocarbonetos a serem testados, como única fonte de carbono e energia. As duas bactérias degradaram o glicerol, a gasolina, o querosene e o diesel e, produziram biossurfactantes. De maneira geral, as bactérias mostraram melhor desempenho na presença de glicerol, como confirmado pelas medidas de densidade celular e atividade emulsificante, enquanto o diesel foi o pior substrato para ambas as bactérias. A produção de biossurfactante foi avaliada medindo-se a sua capacidade para emulsificar o querosene. Através dessa técnica, encontrou-se um percentual de 50% de emulsificação para os biossurfactantes produzidos pelas duas bactérias a partir de glicerol. O *Bacillus* spp., praticamente, não cresceu e não produziu biossurfactante quando cultivado em meio com diesel, sobrevivendo, contudo, na forma de esporos. A suplementação dessa cultura com extrato de levedura 0,04%, entretanto, promoveu a estimulação do crescimento e da produção de biossurfactantes, atingindo um percentual de 95% de emulsificação. Os resultados das análises dos biossurfactantes extraídos a partir das culturas com glicerol, por espectroscopia infravermelha e análises de carboidratos e proteínas, sugerem as classes dos lipossacarídeos e polipeptídios, para os biossurfactantes produzidos pelas bactérias *Acinetobacter* spp. e *Bacillus* spp., respectivamente. As duas bactérias se mostraram suscetíveis ao calor, sendo destruídas à temperatura de 46 °C, 1 ppm de hipoclorito de sódio e pH abaixo de 5,0. Por outro lado, resistiram a 5% de NaCl, uma característica desejável para utilização dessas cepas em situações de biorremediação de ambientes marinhos contaminados com óleo.

ABSTRACT

The present work describes the results of the evaluation of two bacteria strains isolated from the oil polluted effluent, to degrade petroleum derivatives and to produce biosurfactants. Morphologic, cultural, biochemical and physiologic studies showed that these bacteria, previously denominated strain 03 and strain 04, could be identified as *Acinetobacter* spp. and *Bacillus* spp., respectively. The biodegradation potential of these bacteria was evaluated by cultivating them 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 performances at glycerol presence, as confirmed by the measures of cellular density and emulsificant activity, while the diesel was the worst substrate to both bacteria. The biosurfactant production was evaluated by measuring bacteria capacity for emulsifying kerosene. The results showed an emulsification of 50% for the biosurfactants produced from glycerol by the bacteria. *Bacillus* spp., practically, did not grow and did not produce biosurfactant when cultivated in medium with diesel, surviving, however, in the spore form. The supplementation of that culture with 0.04 % of yeast extract, however, stimulated the growth and biosurfactants production, reaching 95% of emulsification. The results of the analyses of the biosurfactants extracted from the cultures with glycerol, by infrared spectroscopy and carbohydrate and protein analyses, suggest the classes of the liposaccharides and polypeptides for the biosurfactants produced by the bacteria *Acinetobacter* spp. and *Bacillus* spp., respectively. These bacteria were shown to be susceptible to heat, being destroyed at the temperature of 46 °C, at 1,0 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.

1. INTRODUÇÃO

As atividades de prospecção e refinamento de petróleo envolvem alguns riscos ao ambiente e, não raro, assistimos aos estragos provocados por derramamento de óleo ao redor do mundo. O Brasil tem registrado vários acidentes com óleo e suas conseqüências são bastante contundentes, como mostrado pela mídia.

Quando ocorre um derramamento de petróleo nos oceanos forma-se uma camada na superfície da água que leva anos para ser eliminada. Isso impede a oxigenação da água, causa a morte de espécies da fauna e flora marinhas e, conseqüentemente, altera todo o ecossistema.

O petróleo é constituído principalmente de hidrocarbonetos, que são compostos que contêm somente átomos de hidrogênio e carbono, 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), insaturados e aromáticos (Barathi & Vasudevan., 2001). Os hidrocarbonetos parafínicos são acíclicos e saturados formados por cadeias abertas que são uma sucessão de átomos de carbono podendo apresentar ou não ramificações, por exemplo, o 2-metil-pentano. Existem ainda os cicloalcanos ou cicloparafinas, que são hidrocarbonetos cíclicos contendo apenas ligações simples. Os hidrocarbonetos aromáticos são formados por ligações simples e duplas que se alternam formando anéis, que quando são constituídos por seis carbonos recebem o nome de benzeno. Estes hidrocarbonetos podem ser classificados em mononucleares, com apenas um anel benzênico ou polinucleares com dois ou mais anéis benzênicos. Quando estes compostos apresentam dois anéis condensados são chamados naftênicos. Os hidrocarbonetos insaturados são aqueles que possuem ligações duplas ou triplas e são extremamente reativos, sendo por isso dificilmente preservados na natureza, mas sua importância está em serem precursores de compostos saturados (parafínicos) e aromáticos. (Tito & Peruzzo, 1998)

Estima-se que sejam despejadas 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.

Atualmente, as soluções mais utilizadas para resolver problemas de derramamento de petróleo, consistem na utilização de substâncias químicas sintéticas ou redes de contenção de óleo. Essas práticas além de não serem muito eficientes, 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. Geralmente, essas bactérias atacam os poluentes com o auxílio de surfactantes, que são moléculas anfipáticas, isto é, formadas por uma região hidrofílica e outra hidrofóbica que agem reduzindo a tensão superficial, facilitando assim, a utilização de compostos imiscíveis em água pelas bactérias.

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 em nosso Estado. Nesse contexto, é nosso interesse 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.

2 – OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve por objetivo proceder ao isolamento e a seleção de bactérias com potencial para degradar derivados de petróleo e produzir biossurfactantes.

2.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar bactérias da água de descarga, contaminada com óleo, de um navio petroleiro na costas cearense;
- Selecionar espécies degradadoras de petróleo e produtoras de biossurfarctantes;
- Otimizar as condições de cultivo para produção de biossurfactantes;
- Isolar e caracterizar parcialmente os biossurfactantes produzidos;
- Proceder a caracterização das cepas selecionadas.

3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

É inquestionável a contribuição do desenvolvimento tecnológico para os processos industriais, mas é, também, alarmante o aumento do número de poluentes que são gerados e que, fatalmente, são lançados no meio ambiente. Muitos poluentes são de difícil degradação, portanto, se acumulam no ambiente e vão interferir no funcionamento normal da biosfera (Linch & Hobbie, 1988; Atlas & Bartha, 1992).

Estudos recentes mostram que os poluentes xenobióticos podem ser removidos do ambiente por uma variedade de vias biológicas, químicas e físicas. As estratégias mais utilizadas para combater os derramamentos de óleo, por exemplo, fazem uso de agentes químicos dispersantes, principalmente surfactantes sintéticos, e coagulantes bem como, meios mecânicos, como redes de contenção. Entretanto, essas são medidas caras e pouco eficientes (Marín *et al.*, 1995).

Atualmente, as técnicas de biorremediação – processo em que os microrganismos são utilizados para eliminação ou detoxificação do ambiente contaminado por xenobióticos – oferecem novas possibilidades para acelerar a degradação destes poluentes, quer adicionando-se os nutrientes necessários à população microbiana natural, quer adicionando-se culturas bacterianas mistas ou puras, que apresentem vias metabólicas que permitam a rápida metabolização do contaminante (Whyte *et al.*, 1996). Como existem restrições à introdução de microrganismos no ambiente, é necessário estabelecer o potencial de biorremediação inerente às espécies autóctones de um determinado local. Por isso, faz-se necessário estudar os processos de biodegradação ou biotransformação de compostos xenobióticos e a biodiversidade das comunidades microbianas responsáveis por estes processos no meio ambiente ao qual já estão adaptadas (Madsen, 1991; Mac Cormack & Fraile, 1997).

Entender como a biodiversidade é desenvolvida e mantida nas comunidades microbianas naturais irá auxiliar nos processos de biorremediação, de maneira que se possa

manipular e controlar essa diversidade, com o intuito de melhorar e estimular as taxas de degradação de compostos em ambientes contaminados (Pritchard *et al.*, 1996).

Os microrganismos estão associados com o petróleo na sua formação, na recuperação de poços de perfuração, na sua decomposição e utilização (Tortora *et al.*, 2000). O petróleo é uma fonte de matéria orgânica e seus hidrocarbonetos são facilmente atacados por uma variedade de microrganismos que alteram ou degradam essas moléculas convertendo-as em ácidos graxos ou dióxido de carbono (Palacios *et al.*, 1997).

A eficiência da biodegradação do petróleo e seus derivados, testada em laboratório tem confirmado a utilidade desse processo e estimulado a adoção dessa prática para remediação de áreas contaminadas (Desai & Banat, 1987; Ururahy *et al.*, 1998; Bicca *et al.*, 1999; Cunha & Leite, 2000).

Os processos biológicos se destacam como uma promissora tecnologia para limpeza de áreas degradadas por sua simplicidade e baixo custo, quando comparados a outras alternativas (Alexandre, 1994). Os principais benefícios da biorremediação são a total mineralização dos poluentes, levando à formação de CO₂, H₂O e biomassa (Prince & Samabsevam, 1993). Várias bactérias são potencialmente capazes de degradar vários hidrocarbonetos para obtenção de carbono e energia. Entretanto, como a maioria dos hidrocarbonetos é imiscível em água, os microrganismos degradadores sintetizam uma série de substâncias, denominadas biosurfactantes, que tem facilitam a difusão destes compostos no meio de crescimento e no interior da célula. Muitos desses microrganismos já foram isolados em amostras de solo, sedimento, água doce ou ambiente marinho (Walker *et al.*, 1976; Cerniglia *et al.*, 1980; Leahy & Colwell, 1990; Gaylarde *et al.*, 1999). As principais espécies degradadoras de petróleo conhecidas pertencem aos gêneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhodococcus* (Sar & Rosenberg, 1983; Kim *et al.*, 1997; Kuyukina *et al.*, 2001).

Os surfactantes são polímeros anfipáticos que atuam reduzindo a tensão superficial em sistemas aquosos (Banat *et al.*, 2000). Além de sua importância na indústria petrolífera, os surfactantes também são utilizados em produtos cosméticos, farmacêuticos, branqueadores domésticos e em alimentos e bebidas (Bartha, 1986; Lang & Wagner, 1989; Neu & Poralla, 1990; Klekner & Kosaric, 1993; Shephord *et al.*, 1995; Banat, 1995a; Banat, 1995b). A grande maioria dos surfactantes disponível comercialmente é sintetizada

a partir de derivados do petróleo. Entretanto, o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com as novas legislações de controle do meio ambiente, levou à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes. Além disso, os biossurfactantes 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).

Vários biossurfactantes já foram isolados e caracterizados. De maneira geral, eles são classificados como glicolipídios, lipossacarídios, lipopeptídios, fosfolipídios, ácidos graxos e lipídios neutros (Zajic & Sefens, 1984).

Embora a exata função fisiológica dos biossurfactantes ainda não tenha sido completamente elucidada, algumas funções lhes têm sido atribuídas: emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, facilitando o crescimento de microrganismos nestes substratos; transporte de hidrocarbonetos, função particularmente atribuída aos biossurfactantes ligados à parede celular; aderência-liberação da célula a superfícies, facilitando a colonização de um dado nicho ecológico; regulação de propriedades da superfície celular e atividade antibiótica, demonstrada por vários biossurfactantes, principalmente da classe dos lipopeptídios e glicopeptídios, que atuam solubilizando os componentes das membranas celulares microbianas ((Nitschke & Pastore, 2002).

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Isolamento, crescimento e identificação parcial de bactérias

As bactérias usadas neste trabalho foram isoladas a partir de um efluente, contaminado com óleo de um navio petroleiro, na costa cearense.

Amostras da água (pura e diluída em solução de NaCl 0,15 M) foram inoculados em Caldo Nutritivo (Merck, Alemanha) e incubadas à temperatura ambiente, por 48 horas. Após o crescimento, as culturas foram semeadas em placas de Agar Nutritivo (Merck, Alemanha) para isolamento das colônias. As colônias que apresentaram características diferentes foram, então, semeadas em placas de Agar Nutritivo para a obtenção de culturas puras.

Os isolados, em número de dez, foram parcialmente identificados através de estudos de suas características culturais, morfológicas e tintoriais de acordo com estratégias sugeridas no *Bergey's: Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg & Holt, 1984). Os 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.

4.2 – Preparação do meio mineral e padronização dos inóculos

As cepas 03 e 04 foram cultivadas em meio Agar Nutritivo, em placa de Petri, por 48 h a 37 °C para obtenção de colônias. Em seguida, uma colônia de cada cepa foi cultivada em Caldo Nutritivo por 24 h a 37 °C. A densidade das culturas líquidas foi medida em espectrofotômetro (Genesys 10 uv, Spectronic) a 600 nm, usando inoculado como branco, para zerar o aparelho. Simultaneamente, procedeu-se a contagem de células viáveis dessas culturas, pela técnica de *spread plate*, segundo Apha (1985). Para tanto, as culturas foram diluídas com solução de NaCl 0,15 M até diluição 10^{-9} . Aliquotas de 100 µl de cada diluição foram semeadas na superfície do meio Agar *Plate Count* (Merck, Alemanha), pH

7, sendo as placas incubadas em estufa a 37 °C, por 48 h. Após o crescimento, procedeu-se a contagem das colônias e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia por ml (ufc/ml).

Os inóculos das cepas 03 e 04 foram ajustadas 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.

4.3 – Biodegradação de derivados do petróleo

O potencial das cepas 03 e 04 para degradar derivados do petróleo e produzir biossurfactantes foi avaliado cultivando-as em meio mineral mínimo contendo um hidrocarboneto como única fonte de carbono e energia, de acordo com a metodologia de Sar & Rosenberg (1983).

O meio mineral usado foi preparado de acordo com Sar & Rosenberg (1983) e continha, por litro de água destilada: 18,34 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 6,0 g KH_2PO_4 , 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 4,0 g $(N, \text{ por } H_4)_2SO_4$, sendo o pH ajustado para 7,0 com HCl 1 M. Este meio foi esterilizado em autoclave a 121° C, por 15 min e, após resfriamento, foi adicionada uma solução de micronutrientes previamente esterilizada em membrana filtrante (0,22 μm , Millipore), na proporção de 0,1% (v/v). A solução de micronutrientes tinha a seguinte composição: $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (10,95 g), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (5,0 g), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (1,54 g), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (392 mg), $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (250 mg), $NaB_4O_7 \cdot 10 H_2O$ (177 mg). Ao meio pronto foi adicionado, asépticamente, gasolina, glicerol, querosene ou diesel, previamente esterilizado em membrana filtrante (0,22 μm , Millipore), para uma concentração final de 2% (v/v).

Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 2,5 litros com 500 ml de meio mineral ou em erlenmeyers de 50 ml com 10 ml de meio. As cepas 03 e 04 foram inoculadas para uma concentração inicial de aproximadamente 10^5 a 10^6 ufc/ml. Os erlenmeyers foram agitados ininterruptamente a 160 rpm, em agitador rotativo, à temperatura ambiente. Imediatamente após a inoculação (tempo zero) e depois, com seis,

24, 48, 72 e 96 h foram retiradas alíquotas das culturas para avaliação da biomassa, feita através de medidas de absorbância a 600 nm e contagens de células viáveis, como descrito no item 4.2 e atividade emulsificante. Os ensaios foram feitos em triplicata.

4.4 – Atividade emulsificante (E24)

A capacidade das cepas 03 e 04 para produzir biossurfactantes foi avaliada através do querosene, de acordo com de Iqbal *et al.* (1995). O método consistiu em adicionar 2 ml de querosene à mesma quantidade da cultura, em um tubo de ensaio com tampa rosqueada, e agitar vigorosamente (*vortex*) por 2 min. Os tubos foram deixados em repouso por 24 h, à temperatura ambiente, e o percentual de emulsificação (E24) foi calculado dividindo-se a altura da camada emulsificada (mm) pela altura da camada total de líquido (mm), multiplicando-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 (Figura 01).

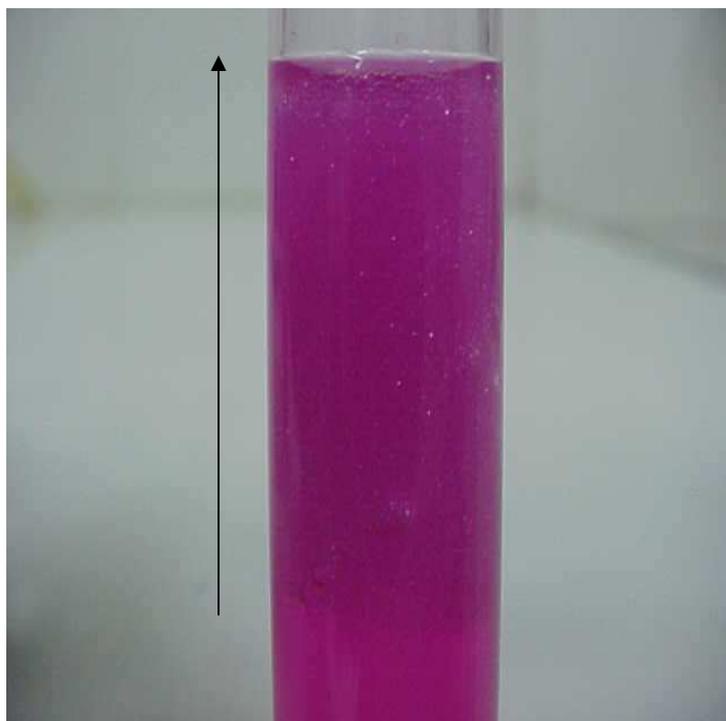


Figura 1– Visualização da altura da camada emulsificada (seta).

4.5 – Extração e caracterização dos biossurfactantes

Para extração dos biossurfactant das bactérias 03 e 04 na presença de glicerol, essas culturas foram centrifugadas a 15.000 g, por 15 min, a 4°C (Centrífuga Jouan, França) para obtenção dos sobrenadantes livres de células. Os sobrenadantes das duas culturas foram misturados com hexana, na proporção de duas partes de sobrenadante para uma parte de solvente. Essa mistura foi levada para funil de separação e deixada em repouso por 24 h. Após esse tempo, a fase superior, contendo o biossurfactante, foi recuperada, lavada com água destilada (por três vezes), sob centrifugação a 15.000 g, por cinco minutos, a 4 °C e, em seguida, liofilizada (Barathi & Vasudevan, 2001).

4.5.1 – Espectroscopia infravermelho

Os biossurfactantes liofilizados foram analisados por espectroscopia infravermelha, através da técnica de disco prensado de KBr, no laboratório do Parque de Desenvolvimento Tecnológico da UFC (PADETEC).

4.5.2 – Determinação de proteína solúvel

A detecção de proteínas nos sobrenadantes das culturas 03 e 04, obtidos a partir dos cultivos na presença de glicerol, querosene, gasolina ou diesel, foi feita seguindo a metodologia descrita por Bradford (1976). A concentração de proteínas foi determinada a partir de uma curva padrão preparada com albumina sérica bovina (BSA). Aliquotas de 100 µl das amostras foram misturadas com 2,5 ml do reagente de Bradford e, após dez minutos, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 595 nm. O branco do ensaio foi preparado misturando-se 100 µl de água destilada mais 2,5 ml do reagente. Todas as amostras foram ensaiadas em triplicata.

4.5.3 – Determinação de carboidratos

As determinações de carboidratos foram feitas segundo a metodologia descrita por Dubois *et al.* (1956). A 100 µl dos sobrenadantes das culturas das cepas 03 e 04, obtidos a partir dos cultivos na presença de glicerol, querosene, gasolina e diesel, como descrito no item 4.5 foram acrescentados 1,0 ml de fenol P.A (Vetec, Brasil), 5,0 ml de ácido sulfúrico P.A (Synth, Brasil) e água destilada para completar 7,0 ml. Os tubos foram vigorosamente agitados, em vortex, e incubados por 30 min, à temperatura ambiente. A absorbância foi lida a 490 nm (Espectrofotômetro Genesys 10 uv, Spectronic), usando água destilada como branco. A determinação de açúcares foi feita usando glucose como padrão.

4.6 – Caracterização bioquímica das cepas produtoras de biossurfactantes

4.6.1 – 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. Para tanto, uma colônia foi friccionada, com o auxílio de uma alça de platina, nas tiras indicadoras. Observou-se, em um período de 20 a 60 segundos, o aparecimento de cor comparando-a com a escala de cor impressa no frasco do fabricante. 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 & Silva, 1999).

4.6.2 – 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 O₂ foi

tomada como indicativo de prova positiva. Foram utilizadas bactérias catalase positiva e negativa como controles (Moura, 1986).

4.6.3 – Teste de Indol, Sulfeto de hidrogênio (H₂S) e Motilidade

O teste de indol serve para determinar a habilidade de um microrganismo em formar indol a partir do aminoácido triptofano. O microrganismo testado foi inoculado por picada central no meio SIM (MERCK, Darmstadt, Alemanha). Os tubos foram incubados a 37 °C, por 24 h. Após incubação, adicionou-se o reativo de Kovac's comercial (p-dimetilaminobenzaldeído, álcool amílico e ácido clorídrico). 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 & Silva, 1999).

O teste do sulfeto de hidrogênio consiste em verificar a liberação de H₂S a partir da ação enzimática sobre os aminoácidos cisteína ou metionina presentes no meio. O teste 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 & Silva, 1999).

O teste de motilidade serve para determinar se um microrganismo possui ou não flagelo. As bactérias em estudo foram inoculadas, por picada central e única, por intermédio de agulha de inoculação 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) (Menezes & Silva, 1999).

4.6.4 – Prova de Citrato

Essa prova serve para determinar se um microrganismo é capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono, com resultante alcalinidade do meio de cultura. O meio utilizado foi o Agar Citrato de Simmons (Merck, Darmstadt, Alemanha) inclinado. O cultivo puro foi semeado por estria central e na superfície do meio, com agulha bacteriológica. 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 & Silva, 1999).

4.6.5 – Teste de O/F (Oxidação e Fermentação)

Este teste foi realizado em meio de Hugh & Leifson, cuja composição é: peptona (2g/l), NaCl (5g/l), K₂HPO₄ (0,3g/l), ágar (3g/l), azul de bromotimol (0,03g/l) e água destilada (litro), pH 7,1. O meio foi levemente aquecido para facilitar a dissolução dos ingredientes, e quando pronto apresenta-se claro e de cor verde. O meio foi esterilizado a 121 °C por 15 min e resfriado a 45 °C em banho-maria. Uma solução de glicose esterilizada por filtro de membrana (0,22 µm, Millipore) 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. Após inoculação por picada central única até o fundo do tubo, metade deles foi imediatamente recoberta com uma camada de cerca de 1 cm de altura de óleo mineral, tipo Nujol previamente esterilizado. Os tubos foram incubados em estufa por 24 h a 37 °C. A interpretação do teste é feita a partir da coloração dos meios. Uma coloração amarela nos tubos fechados (com camada de óleo) e abertos (sem camada de óleo) significa que houve degradação fermentativa do carboidrato. Uma coloração amarela exclusivamente nos tubos abertos mostra que a degradação foi oxidativa (Menezes & Silva, 1999). Culturas de metabolismo oxidativo e fermentativo foram usadas como controles.

4.7 – **Caracterização fisiológica**

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.

4.7.1 – 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. Cada temperatura foi testada em triplicata.

4.7.2 – pH

O efeito do pH foi avaliado em Caldo Nutritivo previamente ajustado com uma solução de NaOH 1 N ou HCl 1 N nos pH 4,0; 5,0; 7,0 (controle); 9,0 e 11,0. Uma colônia da bactéria crescida em Agar Nutritivo em placa de Petri, por 24 h, 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.

4.7.3 – 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 em Agar Nutritivo em placa, por 24 h, 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. Os ensaios foram feitos em triplicata.

4.7.4 – Suscetibilidade ao cloro

Para este teste foram preparadas soluções de hipoclorito de sódio, em água destilada estéril, nas seguintes concentrações 0,1, 1,0 e 10,0 mg/L. Uma colônia da bactéria, crescida em Agar Nutritivo em placa, por 24 h, 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. Essas placas foram 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 tratadas da mesma forma em meio sem hipoclorito de sódio.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Na Figura 02 é mostrada 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.

Como se observa, houve 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. Considerando, que a densidade inicial da cultura era cerca de 10^5 ufc/ml, e que ao final da fase exponencial, essa densidade encontrava-se na ordem de 10^9 ufc/ml, conclui-se que a bactéria degradou o glicerol, já que era a única fonte de carbono no meio. 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.

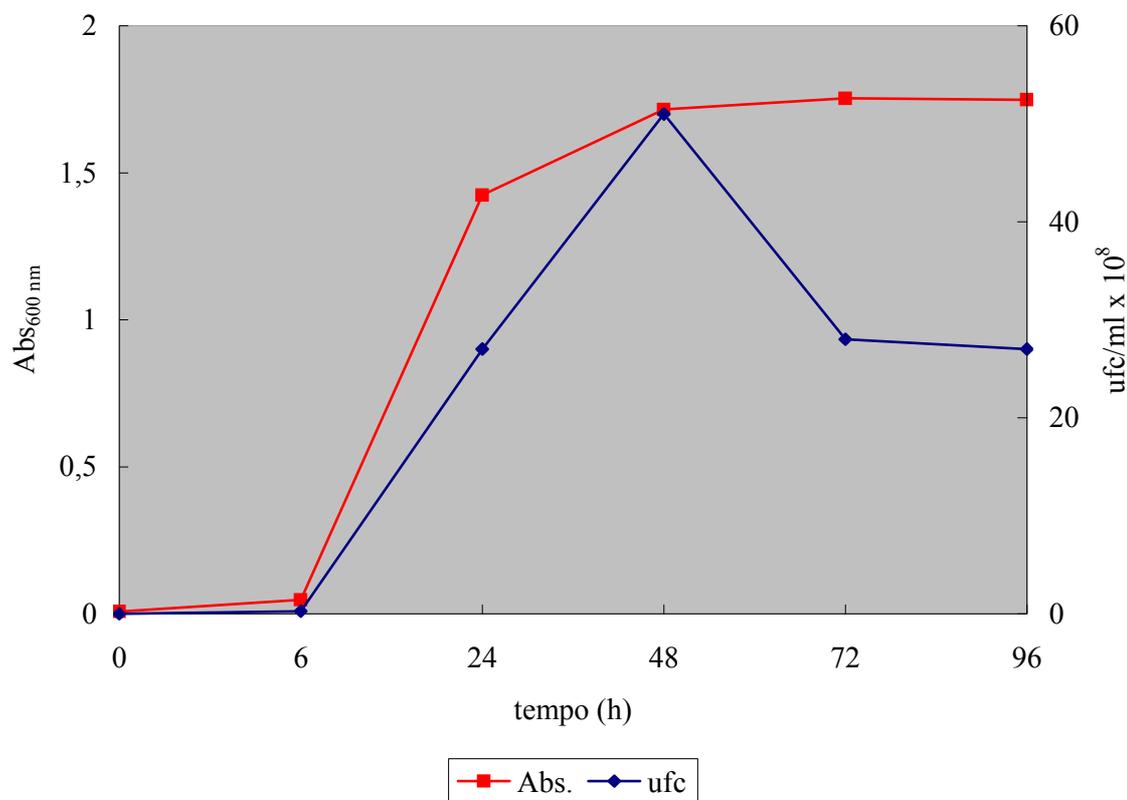


Figura 02 – Curva de crescimento da cepa 03 na presença de glicerol a 2 % (v/v).

A cepa 04 também foi capaz de degradar o glicerol, como mostrado na Figura 03. Semelhantemente à 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. Considerando que as densidades celulares das culturas 03 e 04, no início dos ensaios, foram ajustadas para 10^5 ufc/ml, e 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.

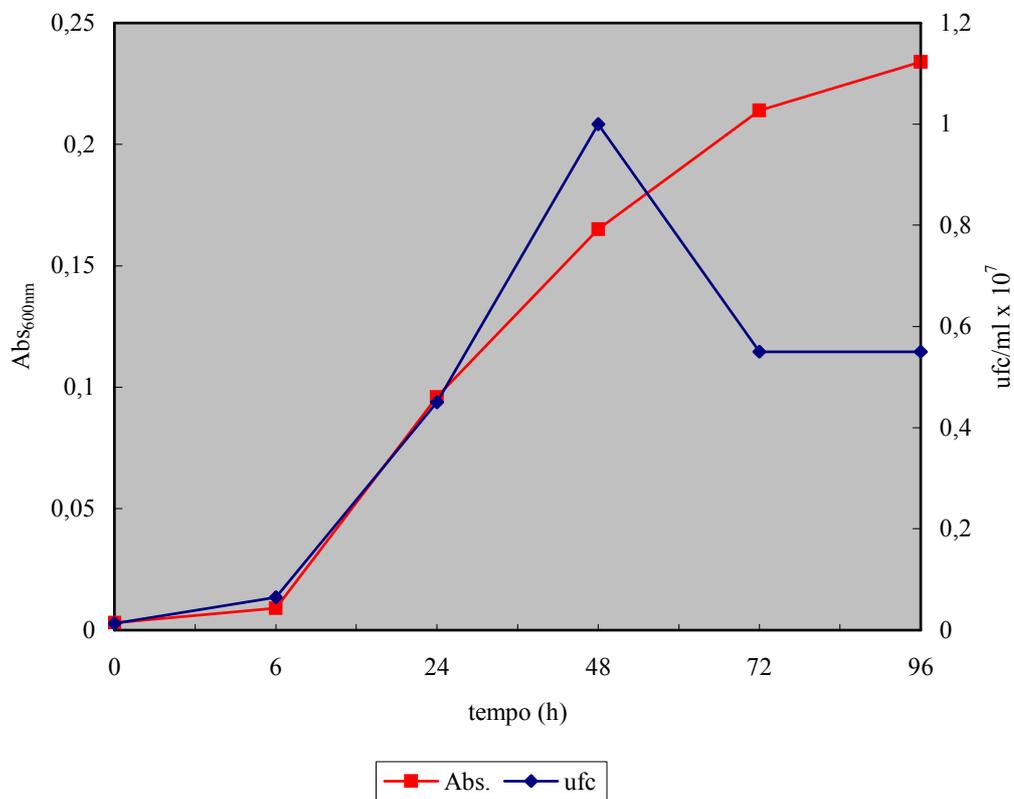


Figura 03 – Curva de crescimento da cepa 04 na presença de glicerol a 2% (v/v).

As cepas 03 e 04 degradaram o glicerol com o auxílio de biossurfactantes, como constatado inicialmente pela presença excessiva de espuma nas culturas (Figura 04).



Figura 04 – Aspecto da cultura da cepa 03, produzindo biossurfactante em meio mineral com glicerol a 2% (v/v).

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 05).

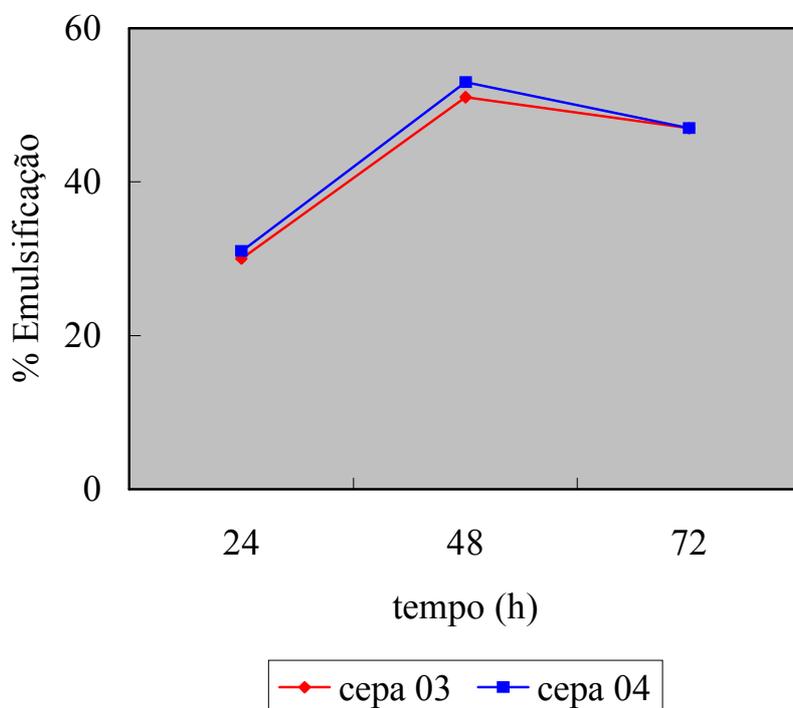


Figura 05 – Emulsificação de querosene pelos biossurfactantes produzidos pelas cepas 03 e 04.

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 como percentual emulsificante (50-60%) desse mesmo substrato pela *Acinetobacter calcoaceticus*, uma bactéria reconhecidamente produtora de biossurfactantes (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>).

O desempenho da cepa 03 frente aos hidrocarbonetos glicerol, gasolina, querosene e diesel está mostrado na Figura 06. A confirmação de que esta cepa degradou esses substratos pode ser inferida a partir da atividade emulsificante.

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 biossurfactante na presença de diesel, como revelado pelo baixo percentual de emulsificação, E24 10%. Entretanto, observou-se um pico de produção de emulsificante com 48 h, para todos os substratos, observando-se uma tendência para a manutenção ou diminuição desta atividade com 168 h. (Figura 06).

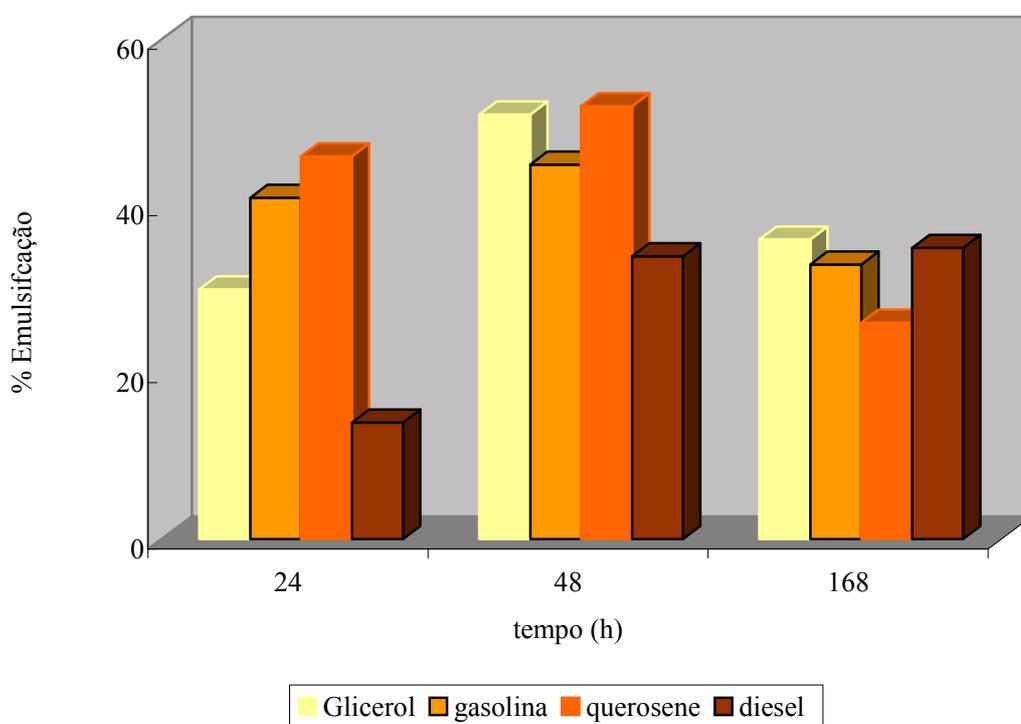


Figura 06 – Biodegradação de glicerol, gasolina, querosene e diesel, na concentração de 2% (v/v), pela cepa 03.

Geralmente, as bactérias degradadoras de petróleo produzem maior quantidade de biossurfactantes ao final da fase exponencial, quando há maior produção de células, tendo

sido sugerido, inclusive, a correlação entre biomassa celular e produção de emulsificante por Sar & Rosenberg (1983) e Kim *et al.* (1997).

A diminuição da atividade emulsificante, observada com 168 h, poderia ser explicada pelo consumo dos biossurfactantes 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.

O desempenho da cepa 04 frente aos quatro derivados do petróleo testados está mostrado na Figura 07. Semelhante à cepa 03, com 24 h, foi detectada atividade emulsificante na presença de gasolina, querosene e glicerol. Entretanto, não se detectou atividade emulsificante para o meio com diesel durante todo o experimento, podendo-se afirmar que a cepa 04 não degradou o diesel, ou se degradou, não foi com o auxílio de emulsificantes. Quando os biossurfactantes 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).

Com 48 h, ocorreu um aumento da emulsificação 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 07).

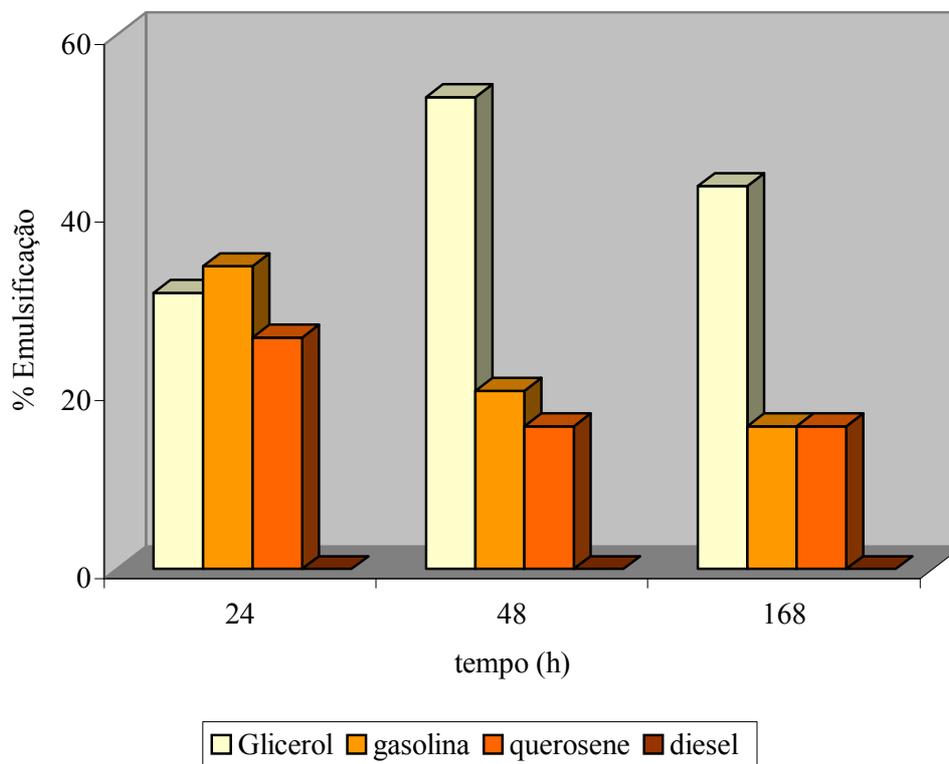


Figura 07 – Biodegradação de glicerol, gasolina, querosene e diesel, na concentração de 2 % (v/v), pela cepa 04.

Para facilitar a compreensão do comportamento da cepa 04 na presença de diesel, vale destacar neste momento da discussão que a cepa 04 é um bacilo Gram-positivo, produtor de esporo. Portanto, a ausência de atividade emulsificante frente ao diesel poderia ser explicada pela esporulação da bactéria neste meio. Neste estado, a bactéria não realiza atividade metabólica, mas também não está morta (Tortora *et al.*, 2000). Para confirmar essa hipótese, esse experimento foi repetido monitorando-se a cultura através de medidas de absorbância, contagens de células viáveis e E24 e observações microscópicas.

Nas primeiras 24 h de cultivo com diesel, houve um aumento no número de células viáveis, de $0,5 \times 10^5$ ufc/ml para 2×10^5 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 de esporos foi confirmada através da observação de lâminas coradas (Figura 08).

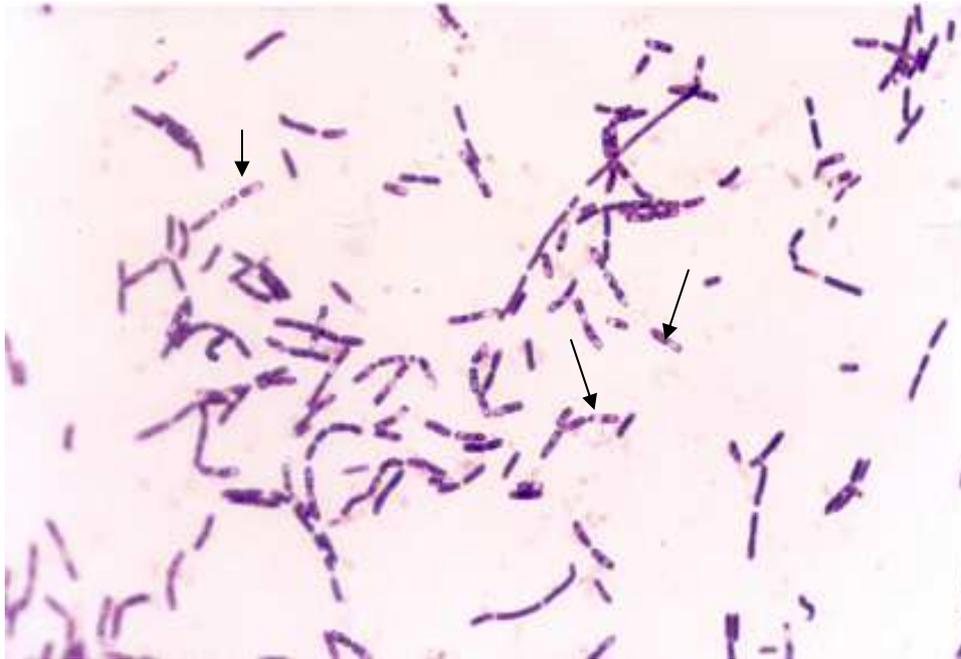


Figura 08 – Cepa 04 – bacilo Gram-positivo. Setas destacando células esporuladas.

Na tentativa de reverter o estado fisiológico das células esporuladas, adicionou-se, assepticamente, 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 (3×10^5 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 emulsificação manteve-se constante até 66 h de cultivo (Figura 09).

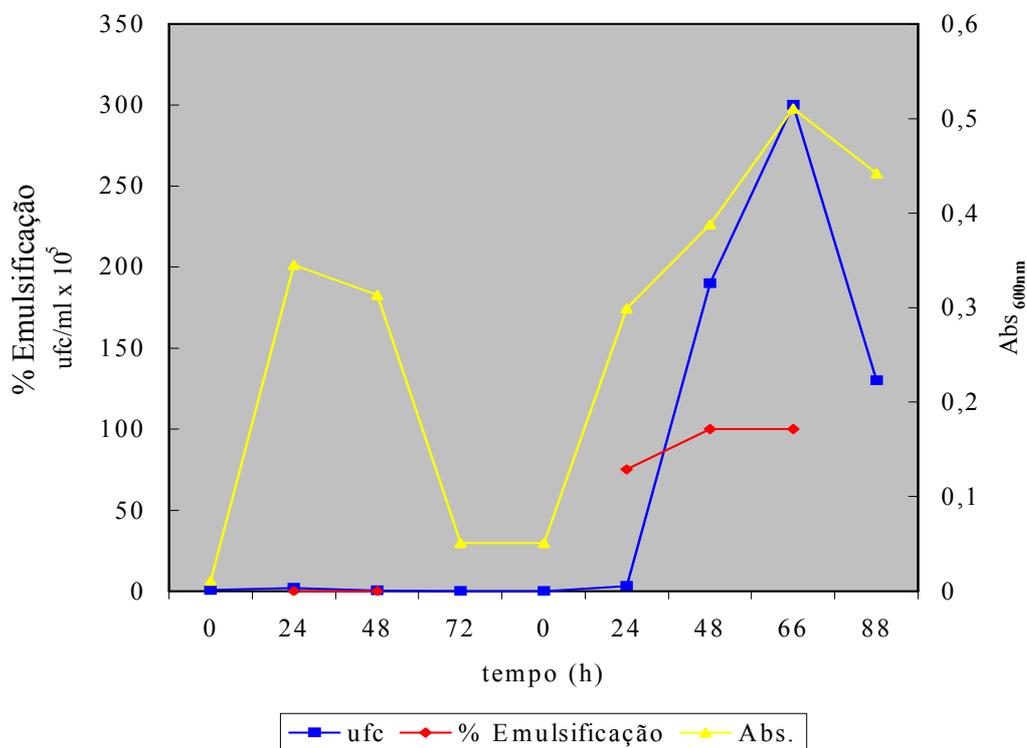


Figura 09 – Biodegradação de diesel pela cepa 04 em meio mineral enriquecido com extrato de levedura 0,04 % após 72 h de cultivo.

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 blucose, sacarose ou até mesmo, extratos vegetais, para enriquecimento do meio mineral. Outros fatores que influenciam a biodegradação são as formas de nitrogênio e fósforo (Marin *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1997; Barathi & Vasudevan, 2001).

De maneira geral, 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. À medida que aumentou o tamanho da cadeia do hidrocarboneto, também aumentou 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).

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 estão mostrados nas Figuras 10 e 11.

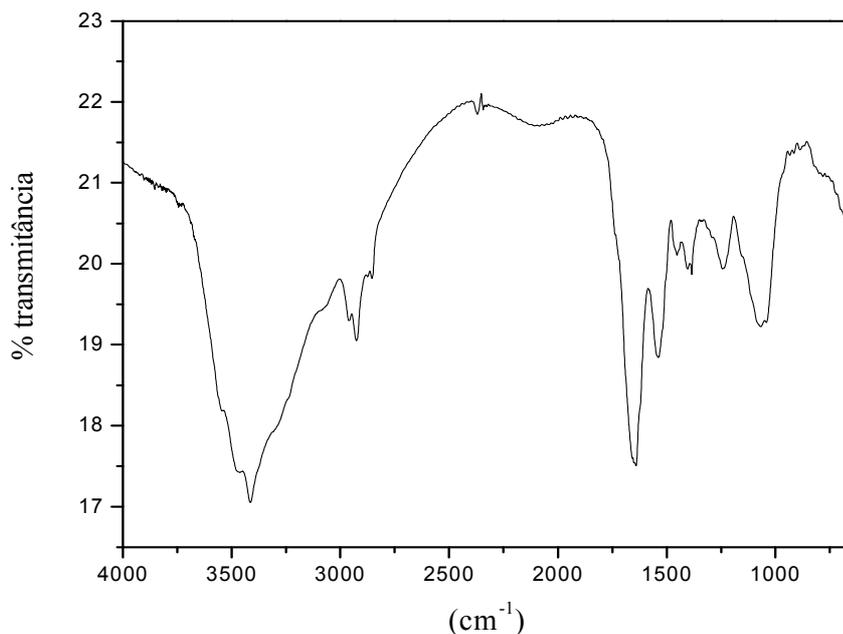


Figura 10 – Espectro infravermelho do biossurfactante produzido pela bactéria 03 cultivada em presença de glicerol, no intervalo de 4000 a 650 cm⁻¹

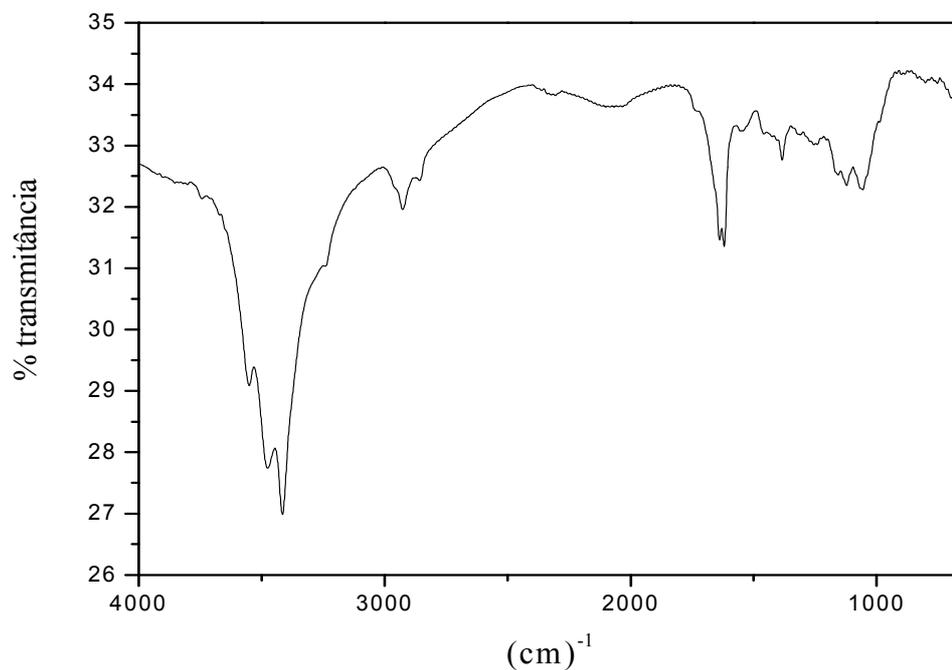


Figura 11 – Epectro infravermelho do biossurfactante produzido pela bactéria 04 cultivada em presença de glicerol, no intervalo de 1000 a 650 cm^{-1}

A análise preliminar desses espectros revelou a presença de grupos funcionais característicos das classes dos lipossacarídeos e polipeptídios, para os biossurfactantes produzidos pelas cepas 03 e 04, respectivamente (Tabela 1). Essas análises foram valiosas e irão auxiliar na identificação definitiva da estrutura química dessas substâncias.

Tabela 1 – Modos vibracionais de grupamentos químicos dos biossurfactantes produzidos pelas cepas 03, 04.

Atributos	Cepa 03	Cepa 04
	cm⁻¹	
NI		1123
NI	1153	1160
C-O est.	1067	1060
C-O est. Éster	1242	1248
NI	1290	
NI	1310	1315
CH ₃ est. sim ² .	1385	1385
NI		1426
NI	1403	
NI		
CH ₃ bend assim ³ .	1452	1457
CN est. E NH dob ⁴ .	1540	1550
NI		1620
NI		1638
C=O est. Amida	1650	
C=O est. Éster	1736	1736
CH ₂ est. Sim.	2855	2858
CH ₃ est. Sim.	2875	2878
CH ₂ est. Assim.	2925	2927
CH ₃ 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

¹ est. = estiramento

² est. sim = estiramento simétrico

³ est. assim = estiramento assimétrico

⁴ dob. = dobramento

A pesquisa de carboidratos nos sobrenadantes das culturas 03 e 04, previamente cultivadas em meio contendo glicerol, gasolina, querosene ou diesel, revelou a presença de açúcares redutores em concentração bastante significativa no sobrenadante da cultura com glicerol mostrado na Figura 12 para a cepa 03. Esse resultado confirma o melhor desempenho dessa cepa para produzir biossurfactante a partir de glicerol. Além disso, reforça os resultados de espectroscopia infravermelha, que sugerem uma estrutura lipossacarídica para esse biossurfactante.

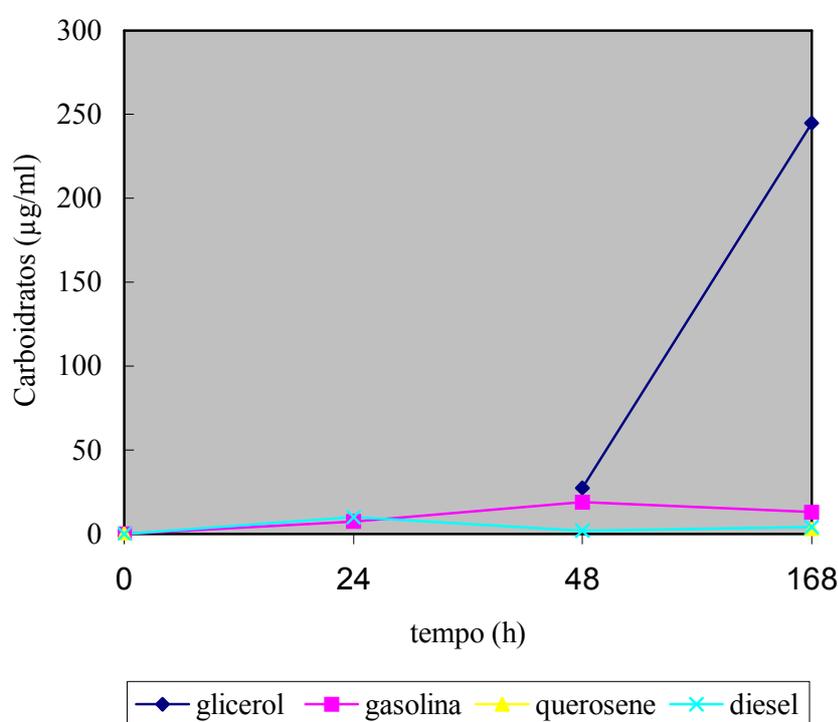


Figura 12 – Concentração de carboidratos nos sobrenadantes obtidos a partir do cultivo da cepa 03 em meio mineral contendo glicerol, gasolina, querosene ou diesel, 2% (v/v).

Na Figura 13 é mostrada a produção de carboidratos pela cepa 04, na presença dos quatro hidrocarbonetos testados. Novamente, detectou-se maior concentração de açúcares redutores para o sobrenadante obtido a partir da cultura com glicerol. Todavia, quando se

compara a concentração de carboidratos nos sobrenadantes do glicerol das cepas 03 e 04, percebe-se claramente que a cepa 03 produziu aproximadamente três vezes mais carboidratos do que a cepa 04.

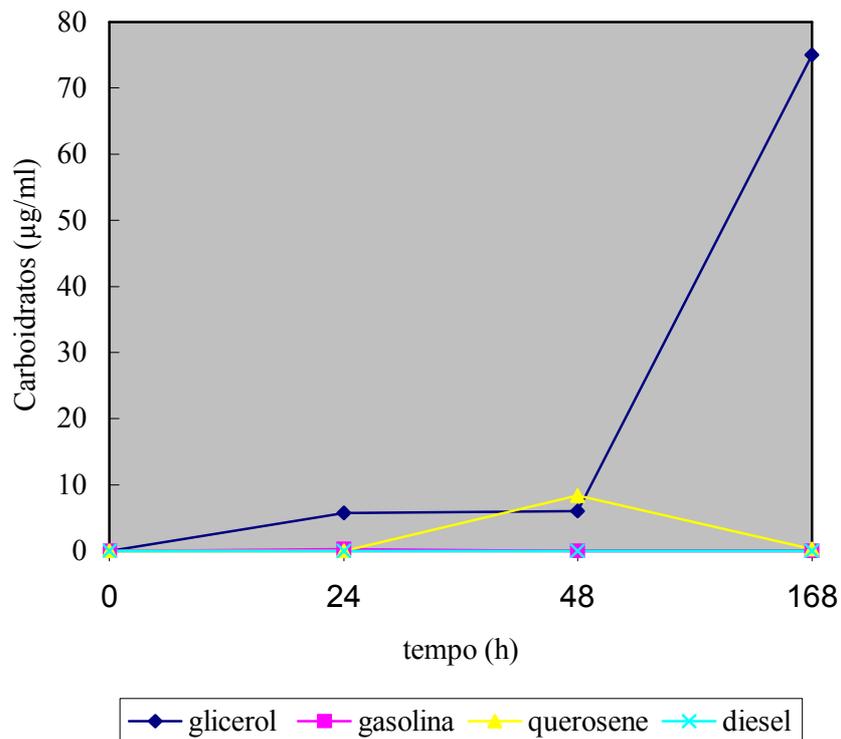


Figura 13 – Concentração de carboidratos nos sobrenadantes obtidos a partir do cultivo da cepa 04 em meio mineral contendo glicerol, gasolina, querosene ou diesel, 2% (v/v).

De maneira geral, detectou-se proteínas nos sobrenadantes obtidos a partir das culturas 03 e 04, cultivadas em meio mineral contendo glicerol, gasolina, querosene ou diesel. Novamente, os sobrenadantes provenientes das culturas com glicerol possuíam, comparativamente, mais proteínas do que os sobrenadantes da gasolina, querosene e diesel. (Figuras 14 e 15).

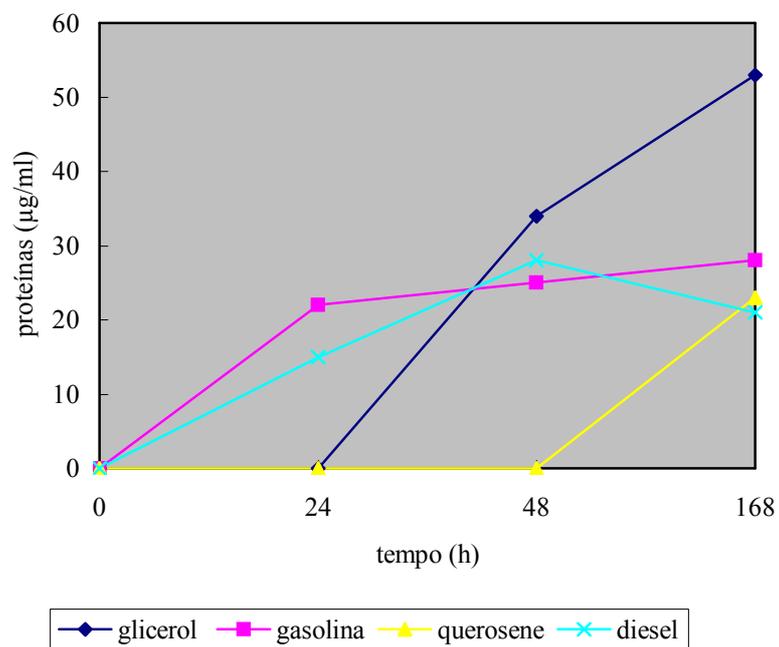


Figura 14 – Concentração de proteínas solúveis nos sobrenadantes obtidos a partir do cultivo da cepa 03 em meio mineral contendo glicerol, gasolina, querosene ou diesel, 2% (v/v).

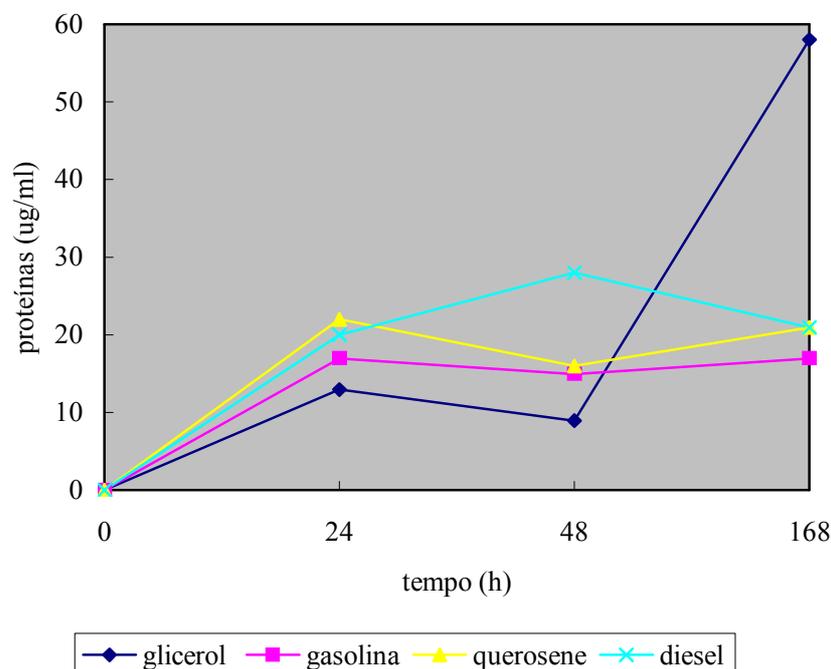


Figura 15 – Concentração de proteínas solúveis nos sobrenadantes obtidos a partir do cultivo da cepa 04 em meio mineral contendo glicerol, gasolina, querosene ou diesel, 2% (v/v).

Os resultados da análise de proteínas no sobrenadante proveniente do cultivo da cepa 04, em glicerol, reforçam os dados de infravermelho, que sugerem uma natureza polipeptídica para esse biossurfactante.

Várias espécies de *Bacillus* produzem biossurfactantes lipopeptídicos. Desses, o mais caracterizado na literatura é a surfactina, composto de uma cauda de ácidos graxos e uma cabeça peptídica, estrutura típica das moléculas anfipáticas que apresentam propriedades emulsificantes (Neu *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1997).

Os resultados do estudo das características morfológicas, culturais, bioquímicas e fisiológicas das cepas 03 e 04 estão mostrados nas Figuras 16 e 17 e nas Tabelas 2 e 3.

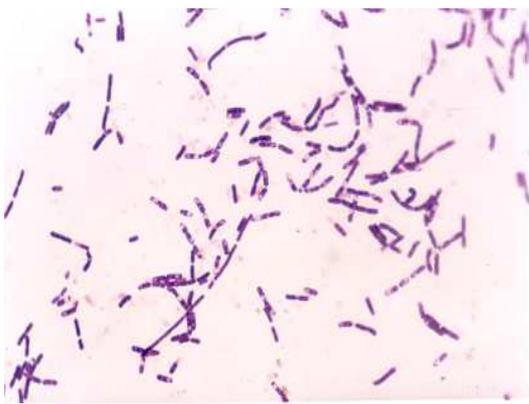


Cepa 03

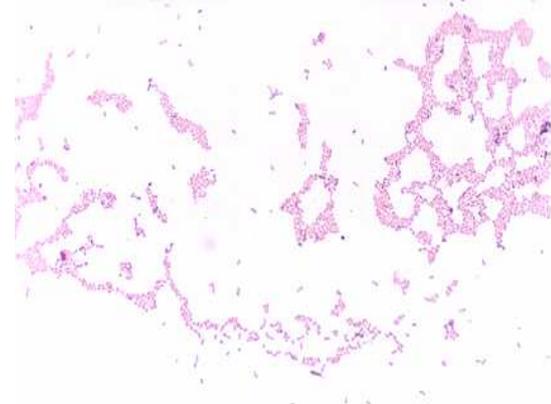


Cepa 04

Figura 16 – Aparência das colônias das cepas 03 e 04 em meio de Agar Nutritivo.



1



2

Figura 17 – Resposta tintorial da cepa 03 (Gram-negativa, foto superior) e cepa 04 (Gram-positiva, foto inferior) à coloração pelo Gram.

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

Características	Cepa 03	217 ¹	ER-96 ²	RAG-1 ³
Morfológicas				
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
Culturais				
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
Bioquímicas				
Oxidase	Negativo	Negativo	Negativo	Positiva
Catalase	Positivo	Positivo	Positivo	-
O/F	Fermentativo	Fermentativo	Oxidativa	-
Citrato	Positivo	Positivo	Positivo	-
H ₂ S	Negativo	Positivo	-	-
Indol	Positivo	Positivo	Negativo	-
Fisiológicas				
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	-	-	-

¹ *A. calcoaceticus* 217 (European Patent Office 0 401 700 A2).

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

³ *A. calcoaceticus* RAG-1(ATCC 31012).

* não disponível.

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

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

Com base em suas características morfológicas, culturais, bioquímicas e fisiológicas e com o auxílio de chaves analíticas do Bergey (Krieg & Holt, 1984), a cepa 03 e 04 foram preliminarmente identificadas como *Acinetobacter* spp. e *Bacillus* spp.

Comparando 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 2), observa-se várias semelhanças. Analisando o conjunto das características morfológicas e culturais é possível afirmar que a cepa 03 apresenta características idênticas a cepa 217. Embora a maioria das características culturais da cepa RAG-1 não estejam disponíveis, 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 2), verifica-se novamente uma marcada semelhança entre as cepas 03 e 217. Com exceção do resultado negativo da cepa 03 para o teste de H₂S, as duas cepas mostram resultados idênticos para as outras provas bioquímicas.

Comparando-se os parâmetros bioquímicos da Tabela 2 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. Infelizmente, não é possível traçar considerações sobre as características fisiológicas da cepa ER-96, pois os dados não foram disponibilizados na literatura. 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.

6 - CONCLUSÕES

As cepas de bactérias 03 e 04 usadas neste trabalho e, preliminarmente identificadas, como *Acinetobacter* spp. e *Bacillus* spp. mostraram um grande potencial para biodegradação de derivados de petróleo e produção de biossurfactantes extracelulares.

Além disso, essas cepas apresentam características fisiológicas e bioquímicas desejáveis para utilização em situações de biorremediação de ambientes marinho contaminados com óleo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexandre, M. *Biodegradation and bioremediation*, **Acad. Press**, 302p, 1994.

American Public Health Association – APHA. Standard method for the examination of dairy products. 410 p, 14 ed. Washington, 1985.

Atlas, R.M. & Bartha, R.. Microbial Ecology *Pseudomonas*, **Biodegradation**, 5: 195-217, 1992.

Banat, I. M, Makkar, R. S, Cameotra, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **App. Microbiol. Biotechnol**,v. 53, p. 495-508, 2000.

Banat, I.M. Biosurfactant production and use in microbial enhanced oil recovery and possible uses in pollution remediation: A Review. **Bioresource Technology**, n.51, p.1-12, 1995 (a).

Banat, I.M. Characterization of biosurfactant and their use in pollution removal state of the art (Review). **Acta Botechnologia**, n.15, p.251-267, 1995 (b).

Barathi, A., Vasudevan, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. **Rev. Environment International**, 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*. **Rev. Microbiol.**, 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. **Anal. Biochem.**, v.72, p. 248-254, 1976.
- Canto, E. L.; Peruzzo, F. M. Química na abordagem do cotidiano; 2ª edição, v.3, p. 43-53, Ed. Moderna, 1998.
- Cerniglia, C.E.; Gibson, D.T. & van Baalen, C. Oxidation of naphthalene by Cyanobacteria and Microalgae. **J. Gen. Microbiol.**, 116:495-500, 1980.
- Cirigliano, M. C., Carman, G. M. Isolation of bio emulsifier form *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, p. 747-750, 1984.
- Cunha, C.D., Leite, S.G.F. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. **Brazil. J. Microbiol.** V.31, p.45-49, 2000.
- Desai, J. D, Banat, I. M, Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbial. Mol. Biol., Rev.**,p. 47-64, 1987.
- Dubois, M. Gilles, K. A. Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F Colorimetric method for determination of sugars and related substance. **Anal. Biochem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- Façanha, P.F.F. Caracterização de Biossurfactantes por Espectroscopia Infravermelho. Dissertação de Mestrado apresentada no Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará., 2003.
- Fiechter, A. Biosurfactantes: moving towards industrial applications. **Trends Biotechnology**, v.10, p. 208-217, 1992.

- Gaylarde, C.C., Bento, F.M., Kelley, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. **Revista de Microbiologia**, 30:01-10, 1999.
- 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.**, 21: 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* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.84, n.1, 1997.
- Krieg, N.R. & Holt, J.G. (ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1984.
- Kuyukina, M.S., Vshina, I.B., Philp, J.C., Christofi, N., Dunbar, S.A., Ritchkova, M.I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**, v.46, p.149-156, 2001.
- Lang, S., Wagner, F. Em biosurfactant: production, properties, application; Kosaric, N., ed.; Marcel Decker: New York, cap. 8, 1993.
- Leahy, J.G. & Colwell, R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiol. Rev.**, 54, 305-313, 1990.
- Mac Cormack, W.P. & Fraile, E.R.. Characterization of a Hydrocarbon Degrading Psychrotrophic Antarctic Bacterium. **Antarctic Science**, 9 (2): 150-155, 1997.
- Machado, B. M. Bactérias extremófilas do efluente final da estação de tratamento de esgoto do campus do Pici (ETE-PICI): Riscos e potencial biotecnológico. Monografia de Graduação, Curso de Ciências Biológicas da UFC, 51, 2002.

- Madsen, E.L. Determining *In Situ* biodegradation. Facts and Challenges. **Environ. Sci. Technol.**, 25 (10): 1663-1673, 1991.
- Marin, M., Pedregosa, A., Rios, S., Ortiz, M.L., Laborda, F. Biodegradation of Diesel and Heating Oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5: its Possible Applications on Bioremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation** 269-285, 1995.
- Menezes & Silva, C.H.P. Bacteriologia: um texto ilustrado. Eventos Ed., Rio de Janeiro, RJ, 531 p, 1999.
- Morán, A.C., Martinez, M.A., Siñeiz, F. Quantification of surfactin in culture supernatants by hemolytic activity. **Biotechnology Letters**, 24: 177-180, 2002.
- Moura, R.A. Microbiologia Clínica, Mc Will Ed. , São Paulo, SP, 185 p. 1986.
- Neu, T.R., Poralla, K. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 32, n.5, pp.151-525, 1990.
- Nitschke, M., Pastore, G.M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Quim. Nova**, v.25, n.5, 772-776, 2002.
- Palacios, A., Becerra, J., Urrutia, H. Biodegradacion de petróleo por dos cepas bacterianas seleccionadas de la Bahia de San Vicente (VIII Region-Chile). *Anais da I reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente*, v. 1, p. 241-245, 1997.
- Prince, M., Sambasivam, Y. Biorremediation of petroleum wastes from the refining of lubricant oils. **Environ. Progress.**, v. 12, p. 146-156,1993.
- Pritchard, P. H.; Mueller, J.G.; Lantz, S.E. & Santavy, D.L. The Potencial Importance of Biodiversity in Environmental Biotechnology. Applications: Bioremediation of

PAH-contaminated Soils and Sediments. *In*: Allsopp, D.; Colwell, R.R. & Hawksworth, D.L. (Eds.). **Microbial Diversity and Ecosystem Function**, Proceed. IUBS/IUMS Workshop, UK, 10-13 August 1993 in support of the IUBS/UNESCO/SCOPE. "Diversitas" Programme. Cab Internacional, UK. 481p, 1996.

Sar, N., Rosenberg, E. Emulsifier Production by *Acinetobacter calcoaceticus* Strains. **Current Microbiology**, v.9, pp. 309-314, 1983.

Shepard, R., Rockey, J.; Sutherland, I.W., Roller, S.J.; **Biotechnol.** 40, 207, 1995.

Tortora, G.J., Funke, B.R., CASE, C.L. **Microbiologia**. 6. Ed., Porto Alegre, Artes Gráficas, 827 p., 2000.

Ururahy, A. F. P, Marins, M. D. M, Vital, R. L, Gabardo, I. T., Pereira Jr, N. Effect of aeration on biodegradation of petroleum waste. **Rev. Microbiol.**, v. 29, p.254-258, 1998.

Walker, J.D.; Colwell, R.R. & Petrakis, L.. Biodegradation of Petroleum by Chesapeake Bay Sediment **Bacteria**. **Can. J. Microbiol.** , 22: 423-428, 1976.

Whyte, L.G.; Greer, C.W. & Inniss, W.E. Assessment of the Biodegradation Potential of Psychrotrophic Microorganisms. **Can. J. Microbiol.**, 42: 99-106, 1996.

Zajic, J.E., Seffens, W. Biosurfactants. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.5, p. 87-107, 1984.