



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

FRANCISCO SYLVÂNIO FERREIRA DA SILVA

**PROSPECÇÃO DE CEPAS BACTERIANAS PRODUTORAS DE
BIOSURFACTANTES NA REGIÃO DO PORTO DO MUCURIBE, FORTALEZA-
CEARÁ**

FORTALEZA

2014

FRANCISCO SYLVÂNIO FERREIRA DA SILVA

**PROSPECÇÃO DE CEPAS BACTERIANAS PRODUTORAS DE
BIOSSURFACTANTES NA REGIÃO DO PORTO DO MUCURIBE, FORTALEZA-
CEARÁ**

Monografia apresentada ao Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Ambientais.

Orientadora: Prof. Dr^a. Oscarina Viana de Sousa.

Co-orientadora: Dr^a. Karla Maria Catter

FORTALEZA

2014

FRANCISCO SYLVÂNIO FERREIRA DA SILVA

PROSPECÇÃO DE CEPAS BACTERIANAS PRODUTORAS DE BIOSURFACTANTES NA REGIÃO DO PORTO DO MUCURIBE, FORTALEZA - CEARÁ

Monografia apresentada ao Instituto de Ciências do Mar (ICMAR) da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Oscarina Vieira de Sousa.
Co-Orientador: Dra. Karla Maria Catter.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Rui Simões de Menezes

S58p Silva, Francisco Sylvânio Ferreira da.

Prospecção de cepas bacterianas produtoras de biosurfactantes na região do Porto do Mucuripe, Fortaleza - Ceará / Francisco Sylvânio Ferreira da Silva – 2014.
62 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Monografia (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Curso de Ciências Ambientais, Fortaleza, 2014.
Orientação: Prof. Dr. Oscarina Vieira de Sousa.
Co-Orientação: Dra. Karla Maria Catter.

1. Biodegradação. 2. Petróleo. 3. Microbiologia. 4. Biosurfactantes - Fortaleza. I. Título.

CDD 620.11223

Ac-143291
Exc-14127373

FORTALEZA

2014

FRANCISCO SYLVÂNIO FERREIRA DA SILVA

PROSPECÇÃO DE CEPAS BACTERIANAS PRODUTORAS DE
BIOSURFACTANTES NA REGIÃO DO PORTO DO MUCURIBE, FORTALEZA-
CE

Monografia apresentada ao Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Ambientais.

Aprovada em: 05/06/2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Oscarina Viana (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Karla Maria Catter (Co-orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Carla do Couto Soares Maciel
Universidade de Fortaleza (Unifor)

À Deus

Aos meus pais Vânia Maria e Sylvio Jeferson
(*In memoriam*) por me ensinarem os valores da
vida e me apoiarem em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força, motivação e auxílio nas horas mais escuras dessa caminhada.

Aos meus preciosos pais, Vânia Maria e Sylvio Jeferson (*In memoriam*) por me amarem e apoiarem em todos os momentos de minha vida. Vocês são tudo pra mim!

À toda minha família pelo apoio em todos os momentos de minha vida.

Às queridas Cristiane Teles, Gleire Menezes e Edirsana Maria pelos conselhos, abraços e alegrias compartilhados comigo. Muito obrigado!

Às queridas Lana Leite e Ariadne Elisa por encherem meus dias no laboratório de alegria.

Aos demais companheiros do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado.

Aos amigos e irmãos de alma Dafne Torelly e Gabriel Neto por verem em mim a força que durante muito tempo eu não consegui ver. Vocês são os melhores!

Às professoras Danielle Sequeira, Sandra Santaella e Kamila Vieira pelos ensinamentos ao longo destes anos na universidade.

Aos colegas da primeira turma de Ciências Ambientais da UFC, em especial aos queridos Carlos Filho, Dafne Torelly, Flora Viana, Juliana Barbosa, Lina de Pádua, Luana Kelly, Michel Kennedy, Rossyane Baracho, Thais Chaves, Vanessa Sancho, Wesley Leitão. Nós fizemos história!

Ao Grupo de Dança Popular da UFC Oré Anacã por despertar em mim o amor pela cultura popular.

Ao CNPq pela bolsa de pesquisa.

À você que direta ou indiretamente contribuiu para a realização desse trabalho e para a minha formação acadêmica. Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha “mãe” de laboratório Karla Catter por me apresentar o incrível e maravilhoso mundo da biodegradação. Muito obrigado por me aceitar de braços abertos em sua equipe de trabalho e investir seu tempo e conhecimento comigo. Muitíssimo obrigado por tudo, minha “mãe”!

Ao meu “irmão” de laboratório Victor Conde pela ajuda e companheirismo em todos os momentos. Obrigado por me ajudar em todos os momentos, em especial aqueles em que estive mais necessitado. Muito obrigado!

À professora Oscarina Viana pela constante orientação, apoio e carinho. Obrigado por investir em mim seu tempo e seu conhecimento e por não medir esforços para que meu crescimento científico fosse possível. Obrigado mais uma vez pelo carinho e por sua amizade.

À professora Regine Vieira por me aceitar nessa família que é o LAMAP. Obrigado pelo exemplo de profissional que és, pelo apoio concedido, pelo incentivo e por seus ensinamentos. Muito obrigado!

“A terra possui recursos suficientes para
prover às necessidades de todos, mas não à
avidez de alguns.” (Mahatma Gandhi)

RESUMO

Derrames de petróleo e seus derivados no meio ambiente geram prejuízos naturais, econômicos e sociais. Os métodos utilizados para reduzir os impactos ambientais baseiam-se em técnicas físicas e químicas. Entretanto, uma das limitações a estes métodos é o alto custo que eles demandam. Uma alternativa a estes métodos convencionais é a biorremediação, que é um processo no qual organismos vivos são utilizados para controlar, remover ou reduzir poluentes no ambiente. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a capacidade de cepas bacterianas, isoladas de água e sedimento marinho do porto do Mucuripe, em degradar hidrocarbonetos de petróleo e produzir biossurfactantes. Foi realizada a purificação das cepas e identificação morfológica através da técnica de coloração de Gram. Os testes de biodegradação de hidrocarbonetos foram feitos tanto com as células bacterianas como com o líquido metabólico das cepas. A capacidade das cepas isoladas em degradar hidrocarbonetos e produzir biossurfactantes foi verificada mediante os seguintes testes: colapso da gota, atividade de emulsificação, capacidade de formação e estabilidade de emulsão. Foram isoladas 20 cepas Gram negativas e 3 Gram positivas, destas, aproximadamente 35% apresentaram forte atividade no teste do colapso da gota, indicando a produção de biossurfactantes. Mais de 90% dos isolados testados obtiveram unidades de atividade de emulsificação (U.A.E.) acima de 1,0. Na determinação do volume de emulsificação com querosene e n-hexadecano, 52% das cepas isoladas formaram emulsões acima de 40%. Os isolados foram capazes de formar e estabilizar emulsões até 168 horas de observação, indicando um potencial biotecnológico para produção de emulsões estáveis. As cepas Gram negativas apresentaram estabilidade de emulsão superior às cepas Gram positivas. Portanto, as cepas bacterianas isoladas de amostras de água e sedimento do porto do Mucuripe foram aptas em degradar querosene, utilizando-o como fonte de carbono e produzindo compostos biossurfactantes/bioemulsificantes.

Palavras-chave: emulsão – querosene – degradação

ABSTRACT

Spills of oil and derivatives at environment causes natural, economics and social losses. The methods used to contain spills are based on physical and chemical techniques. However, the high cost is a limitation of these methods. An alternative to these conventional methods is bioremediation, a process in which living organisms are used to control, reduce or remove pollutants from environment. This research aimed to assess the strains bacterial ability, isolated from marine water and sediment from the Port of Mucuripe, to degrade petroleum hydrocarbons and produce biosurfactants. Purification of the strains and morphological identification by Gram staining technique was performed. The hydrocarbon biodegradation tests were carried out in both bacterial cells as the metabolic liquid. The ability of these strains to degrade hydrocarbons and produce biosurfactants was investigated using the following tests: drop-collapse test, emulsification activity, emulsion stability and turbidity assay. 20 Gram-negative and 3 Gram-positive bacterial strains were isolated, which approximately 35% of the strains showed strong activity in the drop-collapse test, indicating biosurfactant production. More than 90% of the isolated tested had emulsification activity unities greater than 1.0. When the volume of emulsification with kerosene and hexadecane was determinated, 52% of the strains formed emulsions with emulsion volumes above 40%. The isolates were able to form and stabilize emulsions up to 168 hours of observation, indicating a biotechnological potential to produce stable emulsions. Gram negative strains showed higher emulsion stability than Gram positive ones. Therefore, the bacterial strains from Port of Mucuripe were able to degrade kerosene, using it as a source of carbon and producing biosurfactants.

Keywords : emulsion - kerosene - degradation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Elementos do processo de biorremediação.....	22
Figura 2 –	Ação do biossurfactante sobre o petróleo.....	24
Figura 3 –	Mapa de localização dos pontos de amostragem de água no porto do Mucuripe, Fortaleza-CE.....	27
Figura 4 –	Mapa de localização dos pontos de amostragem do sedimento no Porto do Mucuripe, Fortaleza-CE.....	27
Figura 5 –	Garrafa do tipo Van dorn utilizada para coleta de água.....	28
Figura 6 –	Amostrador Van veen utilizado para coleta de sedimento do fundo marinho.....	29
Figura 7 -	Fluxograma do processamento das amostras isoladas de água e sedimento marinho do porto do Mucuripe, Fortaleza-CE.....	31
Figura 8 –	Ilustração da técnica de coloração de Gram.....	32
Figura 9 –	Produção de biossurfactante após 72 horas de agitação em meio Luria Bertani acrescido de querosene.....	33
Figura 10 –	Fluxograma do processo de produção de biossurfactante dos isolados do Fortaleza – CE.....	34
Figura 11 –	Teste do colapso da gota.....	35
Figura 12 –	Altura da emulsão formada (seta).....	37
Figura 13 –	Teste de atividade de emulsificação.....	38
Figura 14 –	Bastonetes Gram negativos isolados do porto do Mucuripe, Fortaleza-CE.....	40
Figura 15 –	Cocos Gram positivos isolados do porto do Mucuripe, Fortaleza-CE.....	40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Estabilidade da emulsão das cepas 1,2,3,4 e 5.....	48
Gráfico 2 – Estabilidade da emulsão das cepas 6,7,8,9 e 10.....	49
Gráfico 3 – Estabilidade da emulsão das cepas 11,12,13 e 14.....	49
Gráfico 4 – Estabilidade da emulsão das cepas 15,16,17,18 e 19.....	50
Gráfico 5 – Estabilidade da emulsão das cepas 20, 21, 22, 23 e do surfactante sintético SDS.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Índice de atividade biossurfactante.....	36
Tabela 2 –	Características morfológicas das cepas isoladas do porto do Mucuripe, Fortaleza-CE.....	39
Tabela 3 –	Parâmetros físico-químicos dos pontos de coleta de água do mar do porto do Mucuripe, Fortaleza - CE.....	41
Tabela 4 –	Resultados do teste qualitativo do colapso da gota e atividade de emulsificação das cepas isoladas da água do mar do porto do Mucuripe, Fortaleza-CE.....	44
Tabela 5 –	Volumes de emulsificação e estabilidade das emulsões produzidas pelas cepas isoladas do porto do Mucuripe. Fortaleza - CE.....	47
Tabela 6 –	Valores de pH dos inóculos crescidos em meio LB (meio com células) e do líquido metabólico das cepas (meio sem células).....	52

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

GLP	Gás liquefeito de petróleo
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
BTEX	Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno
pH	Potencial hidrogeniônico
ANM	Atenuação natural monitorada
CE	Ceará
NaCl	Cloreto de sódio
TSA	Ágar Triptona Soja
B.O.D	Biochemical oxygen demand
LB	Lúria Bertani
UFC	Unidades formadoras de colônias
VE	Volume de emulsificação
ES	Estabilidade da emulsão
VE _t	Volume de emulsificação no tempo t
VE ₀	Volume de emulsificação no tempo 0
U.A.E.	Unidade de atividade de emulsificação
ND	Não determinado
SDS	Sodium dodecyl sulfate
HA	Hidrocarbonetos alifáticos

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Gramas
%	Porcentagem
Km	Quilômetro
µm	Micrômetro
v	Volume
ml	Mililitros
rpm	Rotações por minuto
°C	Graus Centrígrados
µl	Microlitro
mm	Milímetro
M	Molar
nm	Nanômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Hidrocarbonetos de petróleo.....	18
2.2	Contaminação ambiental.....	19
2.3	Biorremediação.....	20
2.4	Biossurfactantes.....	23
2.5	Bioprospecção de organismos marinhos.....	24
3	OBJETIVOS.....	25
3.1	Geral.....	25
3.2	Específicos.....	25
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1	Área de estudo.....	26
4.2	Pontos de coleta.....	26
4.3	Procedimentos de coleta.....	28
4.4	Isolamento de bactérias com potencial biodegradador.....	29
4.4.1	Água.....	29
4.4.2	Sedimento.....	29
4.5	Isolamento bacteriano.....	30
4.6	Parâmetros físico-químicos.....	32
4.7	Caracterização fenotípica das cepas.....	32
4.7.1	Análise morfotintorial.....	32
4.8	Avaliação da produção de biossurfactante.....	33
4.8.1	Inóculo bacteriano.....	33
4.8.2	Produção de biossurfactante.....	33
4.8.3	Extração do líquido metabólico.....	34
4.8.4	Teste do colapso da gota.....	35
4.8.5	Volume de emulsificação.....	36
4.8.6	Atividade de emulsificação.....	37
4.8.7	Determinação do pH.....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1	Parâmetros físico-químicos.....	41

5.2	Avaliação da produção de biossurfactante.....	42
5.3	pH das fermentações.....	51
6	CONCLUSÕES.....	53
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

Desde o século XIX o petróleo vem sendo utilizado para obtenção de energia (AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA, 2008). Os riscos de derrame acidental são intensificados durante os processos de produção, transporte, estocagem de petróleo cru e de seus derivados (CHAGAS-SPINELLI *et al.*, 2013).

O transporte de petróleo e de seus derivados nas regiões de portos associados à atividade de refino aumentam o risco potencial de acidentes nas regiões costeiras. A poluição gerada por estes acidentes nos ecossistemas aquáticos gera prejuízos para o meio ambiente, economia e para a sociedade (KIM, 2002). Derramamentos de petróleo e/ou derivados causam sérios problemas à flora, fauna e aos recursos naturais, afetando diretamente a economia das comunidades pesqueiras locais (BRUNO, 2006). A zona costeira apresenta forte dinamismo e por isso torna-se ainda mais vulnerável em caso de possíveis acidentes envolvendo hidrocarbonetos (PINHEIRO, 2012).

Os métodos utilizados para contenção e remoção da pluma de poluente baseiam-se em técnicas físicas e químicas: barreiras de contenção, materiais absorventes como espuma de polietileno, formadores de gel, dispersantes químicos e injeção de ar (CRAPEZ *et al.*, 2002 e PEPPER; GERBA; BRUSSEAU, 2006). Uma alternativa de tratamento envolvendo processos naturais para a remoção de poluentes é a biorremediação. Esta técnica consiste na utilização de agentes biológicos capazes de decompor ou modificar poluentes alvos em ambientes contaminados ou fora deles (MARIANO; ANGELIS; BONOTTO, 2007). É uma alternativa tecnológica e ecologicamente mais adequada, pois pode possibilitar a completa degradação do poluente, isto é, sua mineralização (BALBA; AL-AWADHI; AL-DAHER, 1998; GAYLARD; BELINASSO; MANFIO, 2005; BONONI *et al.*, 2008). Além dos benefícios citados, a biorremediação requer menor custo quando comparada às técnicas convencionais de tratamento de ambientes contaminados por petróleo e seus derivados (PEPPER; GERBA; BRUSSEAU, 2006).

No processo de biorremediação, o metabolismo de micro-organismos é utilizado para a eliminação ou redução do poluente no ambiente a níveis aceitáveis (COLLA *et al.*, 2008; DASH *et al.*, 2013). A biodegradação de petróleo e derivados, geralmente é mais eficiente quando se utiliza consórcios bacterianos de diferentes gêneros e espécies devido aos seus efeitos de sinergismo e cometabolismo (BALBA; AL-AWADHI; AL-DAHER, 1998; BOOPATHY, 2000).

A utilização de hidrocarbonetos de petróleo como substrato para bactérias com potencial degradador depende da natureza química do composto, das condições ambientais do meio contaminado e da diversidade microbiana (ATLAS, 1981). A biorremediação possibilita a redução dos impactos ambientais gerados por petróleo e derivados, transformando-os muitas vezes em compostos de menor toxicidade ao meio ambiente afetado.

Baseado na necessidade de alternativas viáveis para processos de mitigação de ambientes contaminados por derivados de petróleo, a prospecção de bactérias com potencial biotecnológico é uma etapa necessária e atual dentro das chamadas “tecnologias limpas”.

O porto do Mucuripe está localizado na zona costeira de Fortaleza- CE e atua sob administração da Companhia Docas do Ceará. A característica predominante da carga movimentada no porto é de importação com destaque para granéis sólidos (vegetais, químicos e minerais), granéis líquidos (combustíveis e óleos minerais), contêineres e carga geral. Dentre os combustíveis embarcados estão óleo diesel, gasolina e gás liquefeito de petróleo (GLP). O porto dispõe de um píer petroleiro com berço de atracação exclusivo para movimentação de granéis líquidos. Contudo, pequenas frações de combustíveis e óleos minerais também atracam no Cais Público (GIACOBO *et al.*, 2012).

O risco de poluição marinha por hidrocarbonetos na região existe e aumenta à medida que o transporte destas substâncias é intensificado. Diante disso, é necessário estudar a microbiota marinha da região do porto do Mucuripe com o intuito de selecionar microorganismos com capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo e produzir biossurfactantes.

Este trabalho teve como objetivo selecionar bactérias de amostras ambientais de água e sedimento do porto do Mucuripe com potencial degradador de hidrocarboneto de petróleo (querosene) e produzir compostos biossurfactantes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hidrocarbonetos do petróleo

O petróleo é um composto oleoso inflamável, formado a partir da decomposição da matéria orgânica vegetal e animal que se acumulou ao longo de milhões de anos. É uma substância composta basicamente por hidrocarbonetos, formada por carbono e hidrogênio, à qual podem estar associados a átomos de nitrogênio, oxigênio, enxofre e alguns íons metálicos como o vanádio e níquel (AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA, 2008).

O *American Petroleum Institute* (1999) classifica os hidrocarbonetos de petróleo de acordo com a composição molecular em:

- Aromáticos: são hidrocarbonetos de cadeia benzênica que apresentam alta toxicidade e biodegradação lenta. Dentre estes compostos destacam-se os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs).
- Alcanos: também chamados de parafinas ou alifáticos saturados, estes hidrocarbonetos possuem cadeias normais e ramificadas. São incolores, relativamente inodoros e pouco reativos. Os hidrocarbonetos deste grupo apresentam baixa toxicidade e fácil biodegradação.
- Alcenos (oleafinas ou iso-parafinas): são hidrocarbonetos de cadeia aberta semelhante aos alcanos, com diferença apenas na presença de ligações duplas entre os átomos de carbono. Em geral, possuem baixa concentração no petróleo ou podem ser até ausentes, entretanto são abundantes em subprodutos como a gasolina.
- Cicloalcanos ou nafta: são hidrocarbonetos de cadeias fechadas e saturadas e representam a segunda maior fração em grande parte dos hidrocarbonetos.

O petróleo cru não possui aplicação direta, logo, para ser utilizado, este passa por um processo de refino para obtenção de seus derivados. Nas refinarias, o óleo cru é submetido à ebulição para um fracionamento de seus componentes. Dessa forma, além do processo de extração desse óleo, fazem parte da cadeia produtiva do petróleo os processos de transporte do óleo bruto, refino e distribuição do produto final (AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA, 2008).

O petróleo e seus derivados possuem aplicações na produção de energia e lubrificação. Entre os derivados de petróleo utilizados como combustíveis, destacam-se a gasolina, querosene e óleo diesel. Dentre os componentes da gasolina estão os hidrocarbonetos monoaromáticos conhecidos como BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros de xileno). Estes hidrocarbonetos apresentam elevada toxicidade ao meio ambiente e a saúde humana (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010). O querosene é formado por uma mistura de diferentes hidrocarbonetos parafínicos, oleofínicos e aromáticos (QUEROSENE, 2008). Insolúvel em água, essa mistura possui utilização como combustível de aviação e iluminação, solvente e agente de limpeza. Por sua vez, o óleo diesel é constituído na sua grande maioria por alcanos de cadeia normal, dentre eles o n-hexadecano (SILVA, 2012). Este hidrocarboneto possui alto peso molecular (226,44 g/mol), e apresenta-se insolúvel em água. Sua temperatura de fusão é de 18°C e seus vapores são mais pesados do que o ar (PEDROZO, *et al.*, 2002; HEXADECANO, 2005).

2.2 Contaminação ambiental

A região costeira é submetida a diferentes tipos de poluição devido a sua alta ocupação. Dentre os tipos de degradação que atingem essas áreas estão o lançamento de esgoto doméstico, hospitalar, industrial, derrames de petróleo, dentre outros (BRUNO, 2006).

Os hidrocarbonetos de petróleo podem ser lançados no ambiente costeiro através de descargas industriais e municipais bem como escoamento urbano, deposição atmosférica e vazamentos naturais de petróleo e derivados (JOEL e AMAJUOYI, 2009).

O petróleo é liberado para o meio ambiente através de acidentes durante os diferentes processos de produção, transporte, estocagem e refino desse composto (PEDROZO *et al.*, 2002). O petróleo pode infiltrar no solo através da ação da gravidade e depositar-se em horizontes inferiores, podendo chegar até os aquíferos subterrâneos. Durante a migração do óleo pelo perfil do solo, uma pequena fração desse composto permanece retida em suas partículas, constituindo a chamada fração residual de saturação. Essa fração constitui fonte de contaminação, podendo estender-se à água e ao ar através da chuva ou ação dos ventos (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 1999). O destino e o comportamento de poluentes orgânicos no solo dependem de diversos fatores, dentre eles: as características do solo, suas propriedades físicas e fatores ambientais como a temperatura e a precipitação (REID; JONES; SEMPLE, 2000).

Os oceanos recebem todos os rejeitos lançados ao longo do continente, dentre eles os hidrocarbonetos de petróleo. Estes compostos podem depositar-se nos corpos d'água direta ou indiretamente. O contato direto ocorre devido ao lançamento do contaminante através de fontes pontuais (plataforma de petróleo, por exemplo) ou difusas (lançamento doméstico de derivados de petróleo ou produtos automotivos) nos corpos hídricos continentais. O contato indireto se dá através da lixiviação de solos contaminados ou pela deposição atmosférica destes compostos (LOPES, 2009).

Os efeitos do petróleo na biota marinha podem ser agudos ou crônicos (GANDRA, 2005). A mancha de óleo ao espalhar-se pela água, bloqueia a penetração da luz impedindo a realização da fotossíntese pelo fitoplâncton. A redução deste processo afeta diretamente a produtividade primária na água, comprometendo os níveis tróficos superiores (BRUNO, 2006).

O petróleo causa deficiência na respiração e locomoção nos animais aquáticos, levando-os a morte por asfixia ao permanecerem presos na mancha de óleo. O óleo pode causar lesões hepáticas em peixes. Em mamíferos, pode ocorrer o processo de bioacumulação devido à ingestão de alimento contaminado, aumentando a concentração desse composto em níveis tróficos superiores. Além disso, o petróleo pode causar a perda da função termorreguladora dos pelos destes animais, levando-os a hipotermia. O petróleo ao ser retido nas penas das aves reduz a sua capacidade termorreguladora, causando a perda da capacidade de flutuação na água e seu afogamento na mancha de óleo. Em recifes de corais, o óleo pode causar a morte por recobrimento ou por intoxicação. Em manguezais, o óleo ao ser retido nas raízes aéreas dos mangues fecha as lenticelas e impede a respiração vegetal. A redução de peixes e plânctons na água reduz a reserva de alimentos de níveis tróficos superiores afetando toda a cadeia alimentar local (FERNANDES, 2001; BOTELHO, 2003; LOPES; MILANELLI; POFFO, 2007).

Diante dos impactos gerados por acidentes envolvendo petróleo e seus derivados, faz-se necessária a utilização de processos e/ou alternativas que objetivem a recuperação ambiental das áreas contaminadas.

2.3 Biorremediação

A biorremediação consiste na utilização de organismos vivos, em geral animais ou plantas, para remoção de poluentes do ambiente e a sua transformação em produtos de menor ou nenhuma toxicidade (GAYLARD; BELINASSO; MANFIO, 2005; SINGH *et al.*, 2008).

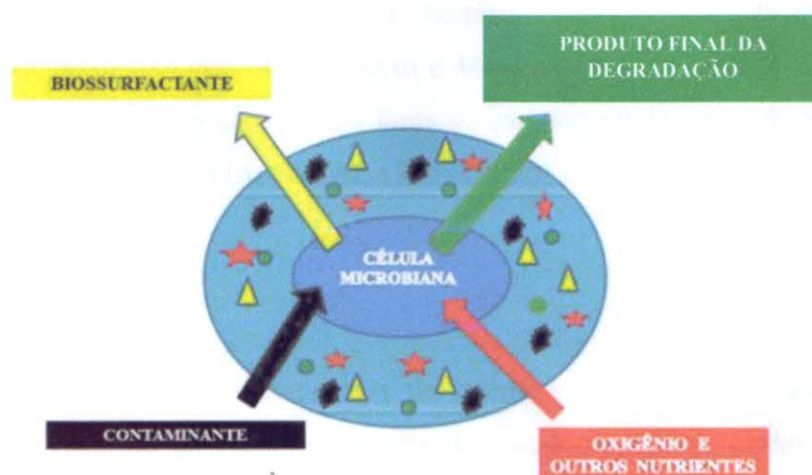
Este processo ocorre naturalmente no ambiente e visa a degradação do poluente, podendo resultar na sua degradação completa, assim como a sua conversão em produtos inócuos (BALBA; AL-AWADHI; AL-DAHER, 1998). A biorremediação é ecologicamente a alternativa mais adequada dentre os métodos de mitigação de áreas afetadas por petróleo, pois possibilita a degradação do poluente por mecanismos naturais (BONONI *et al.*, 2008).

No tratamento de locais contaminados por petróleo e derivados existem três possíveis abordagens de uso da biorremediação: biorremediação intrínseca, bioestímulo e bioaumento.

- Biorremediação intrínseca: também conhecida como atenuação natural monitorada (ANM), essa técnica consiste na remoção do contaminante por meios bióticos “in situ” com o passar do tempo sem a adição de nutrientes e/ou agentes estimulantes pelo homem. Os processos envolvidos nesta técnica são de origem natural (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM; 2010).
- Bioestímulo: nesta técnica há o estímulo de microbiota nativa, “in situ” ou “ex situ”, através da otimização das condições ambientais como temperatura, pH, nutrientes e oxigênio a fim de aumentar as taxas de biodegradação (SILVA, 2012).
- Bioaumento: consiste na adição de uma microbiota endógena ou exógena já adaptada ao poluente alvo a fim de acelerar o processo de degradação seja ele “in situ” ou “ex situ” (JUWARKAR; SINGH; MUDHOO, 2010; SILVA, 2012). Entretanto, há uma preocupação ambiental em utilizar espécies exóticas no tratamento de locais contaminados. Espécies alóctones podem inibir a biota indígena, podendo causar desequilíbrios ecológicos no ecossistema (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2014).

No processo de biodegradação de hidrocarbonetos os micro-organismos tendem a produzir substâncias responsáveis por aumentar a taxa de consumo do poluente. Esses produtos formados são chamados de biossurfactantes e são responsáveis pela solubilização do hidrocarboneto, potencializando as taxas de biodegradação (SILVA, 2012). O biossurfactante produzido irá auxiliar na biodegradação do contaminante, podendo resultar em produtos de menor toxicidade. Entretanto, em muitos casos, o produto final da degradação microbiana de hidrocarbonetos pode ter toxicidade maior do que o poluente original, sendo necessária a avaliação da sua toxicidade para que se possa conhecer seus efeitos no ambiente. A figura 1 ilustra o processo de biodegradação de hidrocarbonetos.

Figura 1 - Elementos do processo de biorremediação.



Fonte: Adaptado de <http://www.natureswaygreen.com/bioremediation.htm>.

Uma variedade de bactérias e fungos possuem a capacidade de utilizar hidrocarbonetos como substrato (LEAHY e COLWELL, 1990). Dentre esses organismos, as bactérias são comumente utilizadas como agentes degradadores devido ao rápido crescimento destes organismos em ambientes contaminados e à sua capacidade de utilizar diferentes hidrocarbonetos como fonte de carbono (WOLICKA *et al.*, 2009).

Apesar de corresponderem por menos de 1% da comunidade microbiana marinha natural, os micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos podem se multiplicar e representar mais do que 10% da população microbiana em locais contaminados por hidrocarbonetos (TEIXEIRA *et al.*, 2010).

Bactérias isoladas do ambiente marinho possuem potencial uso na biorremediação e podem se tornar candidatas ideais para tratamento de habitats extremamente poluídos. Os micro-organismos marinhos respondem rapidamente às mudanças dos padrões ambientais e devido à essa característica podem ser utilizados também como bioindicadores de qualidade ambiental (DASH, 2013).

Diversos são os estudos que avaliam a capacidade de isolados bacterianos em degradar hidrocarbonetos de petróleo (CATTER *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2009; MAHJOUBI *et al.*, 2013). Em muitos estudos, os micro-organismos com potencial degradador foram isolados de ambientes já contaminados por óleo (GOMES *et al.*, 2009; JACOBUCCI; ORIANI; DURRANT, 2009; VIRAMONTES-RAMOS *et al.*, 2010).

Uma variedade de micro-organismos aeróbios tem sido descrita como degradadoras de hidrocarbonetos, com destaque para bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus* e *Micobacterium*. Muitos destes micro-organismos utilizam hidrocarbonetos como única fonte de carbono (JUWARKAR; SINGH; MUDHOO, 2010; THAVASI; SHARMA; JAYALAKSHMI, 2011).

2.4 Biossurfactantes

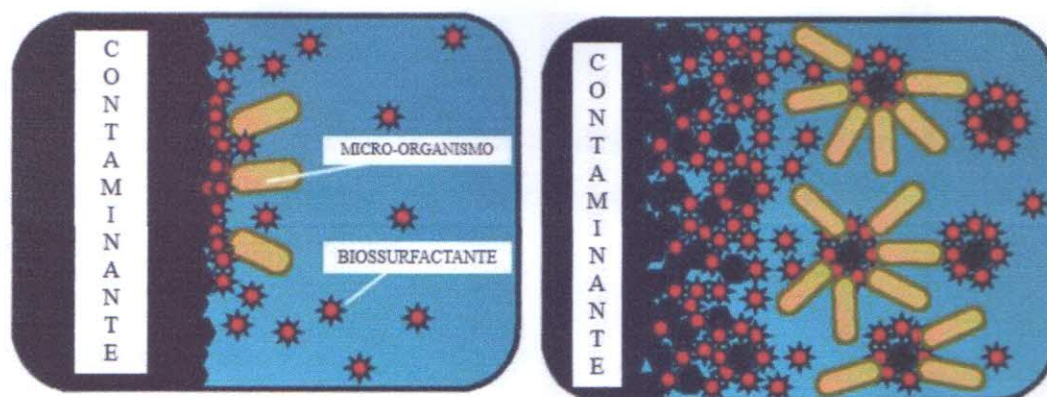
Os surfactantes são compostos de estrutura molecular com grupos hidrofílicos e hidrofóbicos capazes de reduzir a tensão superficial de misturas com fases e polaridades diferentes como água e óleo (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Por sua vez, os biossurfactantes são surfactantes naturais de origem microbiana que atuam como dispersantes e solubilizantes de compostos orgânicos (GOUVEIA *et al.*, 2003).

Os biossurfactantes são alternativas aos surfactantes sintéticos, pois estas substâncias são amplamente utilizadas em escala industrial e são sintetizados a partir de derivados de petróleo (NITSCHKE e PASTORE, 2002; PINTO; MARTINS; COSTA, 2009). Além disso, os surfactantes naturais são biodegradáveis, estáveis em condições extremas de temperatura, pH e salinidade (MAHJOUBI *et al.*, 2013).

Os biossurfactantes possuem propriedades de adsorção, formação de macro e micro emulsões, ação espumante ou antiespumante, solubilidade, detergência e dispersão de fases (NITSCHKE e PASTORE, 2002; GOUVEIA *et al.*, 2003). Estas substâncias permitem o crescimento de micro-organismos em compostos insolúveis em água (hidrocarbonetos) e em outro substrato lipofílico. Sendo assim, permitem a solubilização de hidrocarbonetos na água, reduzindo a tensão superficial entre as fases orgânicas e aquosas (JACOBUCCI *et al.*, 2009; MAHJOUBI *et al.*, 2013).

Um dos grandes fatores que impedem a biorremediação de ambientes aquáticos contaminados por hidrocarbonetos é a biodisponibilidade do poluente para a microbiota (DASGUPTA; GHOSH; SENGUPTA, 2013). A hidrofobicidade dos hidrocarbonetos é um fator que torna tais compostos biologicamente indisponíveis no meio ambiente, impedindo que muitos dos micro-organismos utilizem estes compostos como fonte de carbono. Entretanto, os biossurfactantes possuem papel crucial para degradação desses compostos, pois, permitem a dispersão do contaminante, tornando-o biologicamente disponível para a degradação microbiana (WETLER-TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010). A figura 2 ilustra o processo de dispersão de hidrocarbonetos por compostos biossurfactantes.

Figura 2 – Esquema representando a ação dos biossurfactante sobre o petróleo.



Fonte: Adaptado de <http://www.natureswaygreen.com/bioremediation.htm>.

2.5 Bioprospecção de organismos marinhos

O Brasil detém cerca de 15 a 20% da biodiversidade mundial (LOPES *et al.*, 2005). Os investimentos em pesquisas, que exploram tais recursos, são realizados no intuito de desenvolver produtos naturais (bioprodutos) que possuam aplicação tecnológica, para melhoria da qualidade de vida e do meio ambiente.

A bioprospecção consiste na exploração e utilização de recursos genéticos e bioquímicos a fim de se obter novos produtos ou processos para uso comercial (CARDOSO, 2013). Por corresponder a 70% da superfície terrestre, o oceano é uma fonte rica de recursos biológicos e agentes químicos (SYNNE, 2007). A costa brasileira com 8698 km de extensão apresenta uma alta biodiversidade, levando cada vez mais pesquisadores a explorem os recursos marinhos e seu potencial biotecnológico (TEIXEIRA *et al.*, 2010).

Há grande interesse em isolar micro-organismos de áreas contaminadas com hidrocarbonetos, pois estes normalmente, apresentam alta capacidade de adaptação ao meio impactado, são mais resistentes às alterações ambientais e são menos susceptíveis à variações genéticas causadas por estresse no meio (CERQUEIRA *et al.*, 2011). O amplo conhecimento acerca da biodiversidade e da prospecção de novos organismos é um dos principais focos da biotecnologia. Tal conhecimento permitirá uma melhor gestão de áreas contaminadas (BRITO, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar prospecção de bactérias de ambiente marinho na região portuária de Fortaleza, com potencial em degradar hidrocarbonetos de petróleo e produzir biossurfactantes/bioemulsificantes.

3.2 Objetivos específicos

1. Isolar cepas bacterianas do ambiente marinho com potencial em degradar querosene comercial;
2. Avaliar a capacidade das cepas isoladas em produzir biossurfactantes;
3. Verificar o potencial dos isolados bacterianos em formar e estabilizar compostos emulsificantes frente a querosene e n-hexadecano;
4. Realizar a caracterização físico química da amostra de água coletadas;
5. Verificar o pH dos meios de crescimento bacteriano utilizando querosene como fonte de carbono.
6. Comparar o surfactante sintético Dodecil Sulfato de sódio com os biossurfactantes produzidos pelas cepas isoladas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

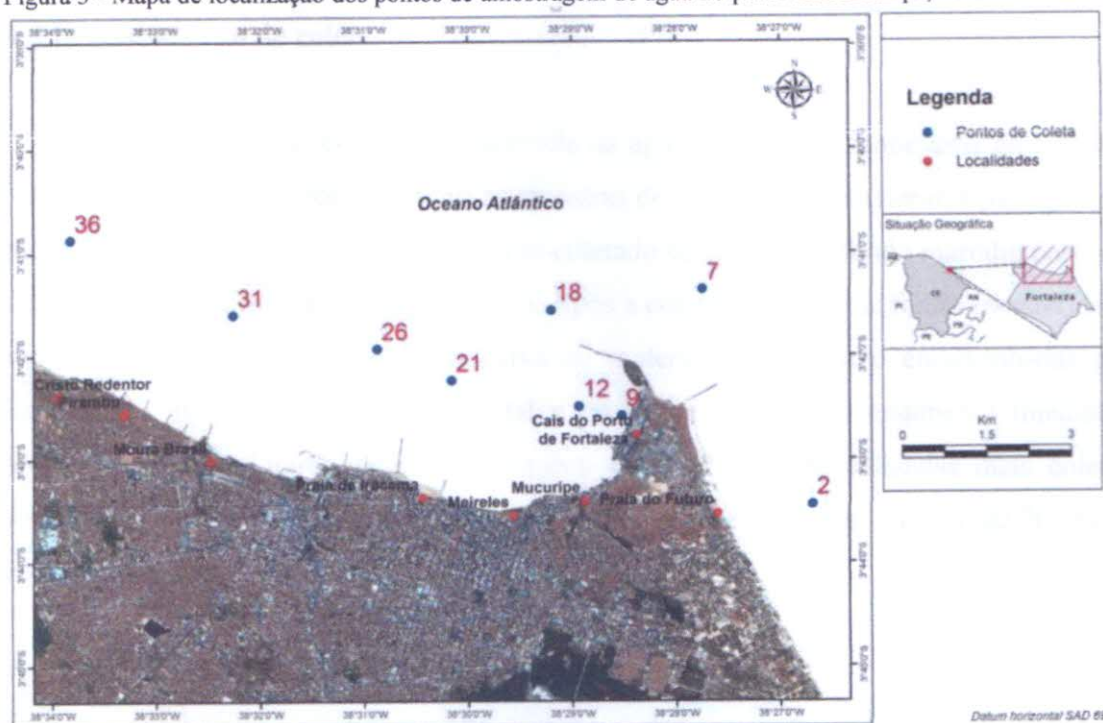
4.1 Área de estudo

O porto do Mucuripe está localizado na enseada do Mucuripe, na cidade de Fortaleza - CE. Este possui um cais acostável com 1080 metros de extensão com seis berços de atracação e um píer petroleiro com dois berços de atracação exclusivos para movimentação de granéis líquidos. A maior parte dos granéis líquidos movimentados é de derivados de petróleo, em especial óleo diesel, gasolina e GLP (GIACOBO *et al.*, 2012).

4.2 Pontos de coleta

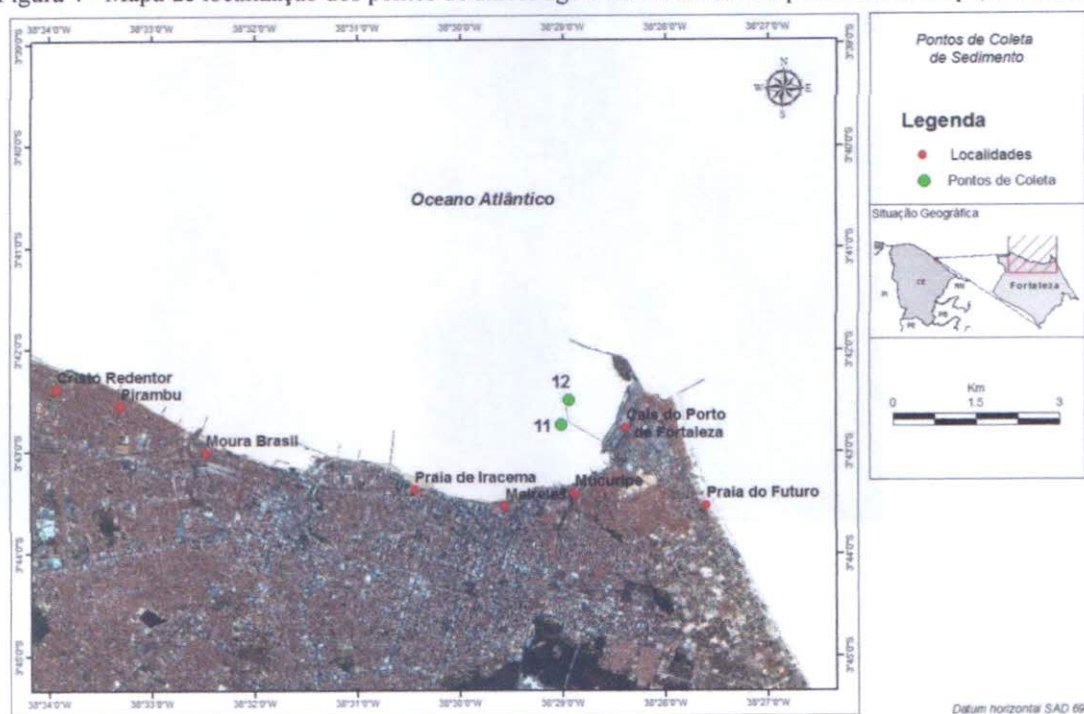
Foram selecionados 9 pontos de amostragem da superfície da água (2, 7, 9, 12, 18, 21, 26, 31, 36) do entorno do porto do Mucuripe (Figura 3). O sedimento do fundo marinho foi coletado em dois pontos localizados próximos ao píer petroleiro (11 e 12), apresentados na figura 4. Os pontos de água e sedimento foram escolhidos com o intuito de estudar a microbiota da água próxima às áreas de atracação do porto. Alguns pontos coletados (9 e 12) estão localizados próximos ao píer petroleiro, enquanto o restante dos pontos está distribuído ao longo da costa de Fortaleza. No sentido leste, o ponto de coleta mais distante é o 2 localizado na Praia do Futuro. No sentido oeste, o ponto mais distante é o 36 e está localizado próximo a comunidade do Cristo Redentor, bairro Pirambu.

Figura 3 - Mapa de localização dos pontos de amostragem de água no porto do Mucuripe, Fortaleza-CE.



Fonte: Fundação Cearense de Pesquisa e Cultura, 2012.

Figura 4 - Mapa de localização dos pontos de amostragem do sedimento no porto do Mucuripe, Fortaleza-CE.



Fonte: Fundação Cearense de Pesquisa e Cultura, 2012.

4.3 Procedimentos de coleta

Foram realizadas coletas da superfície da água do mar utilizando uma garrafa do tipo Van-dorn (Figura 5). Após coletadas, as amostras de água foram transferidas para garrafas de vidro âmbar, previamente esterilizadas. Foi coletado sedimento do fundo marinho com auxílio de uma draga do tipo Van-veen (Figura 6). Após a coleta, as amostras foram transferidas para sacos plásticos, acondicionadas em caixa de material isotérmico e encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado para processamento imediato. As amostras de água foram obtidas em outubro de 2012. Foram realizadas duas coletas de sedimento nos dois pontos descritos em períodos diferentes: uma em outubro de 2012 e outra em maio de 2013.

Figura 5 - Garrafa do tipo Van dorn utilizada para coleta de água.



Fonte: Fundação Cearense de Pesquisa e Cultura, 2012.

Figura 6 - Amostrador Van veen utilizado para coleta de sedimento do fundo marinho.



Fonte: Fundação Cearense de Pesquisa e Cultura, 2012.

4.4 Isolamento de bactérias com potencial biodegradador

4.4.1 Água

Foram transferidos 10 ml de cada amostra para frascos de Erlenmeyer contendo meio mineral Bushnell–Haas (Difco) acrescido de querosene previamente esterilizado em membrana filtrante (0,22 μm , Millipore) na concentração de 2% (v/v). Os Erlenmeyers foram mantidos sob agitação de 150 rpm a 30°C. Neste experimento foram realizadas duas repetições para cada amostra, onde um Erlenmeyer foi incubado por 48 horas e outro por 72 horas.

4.4.2 Sedimento

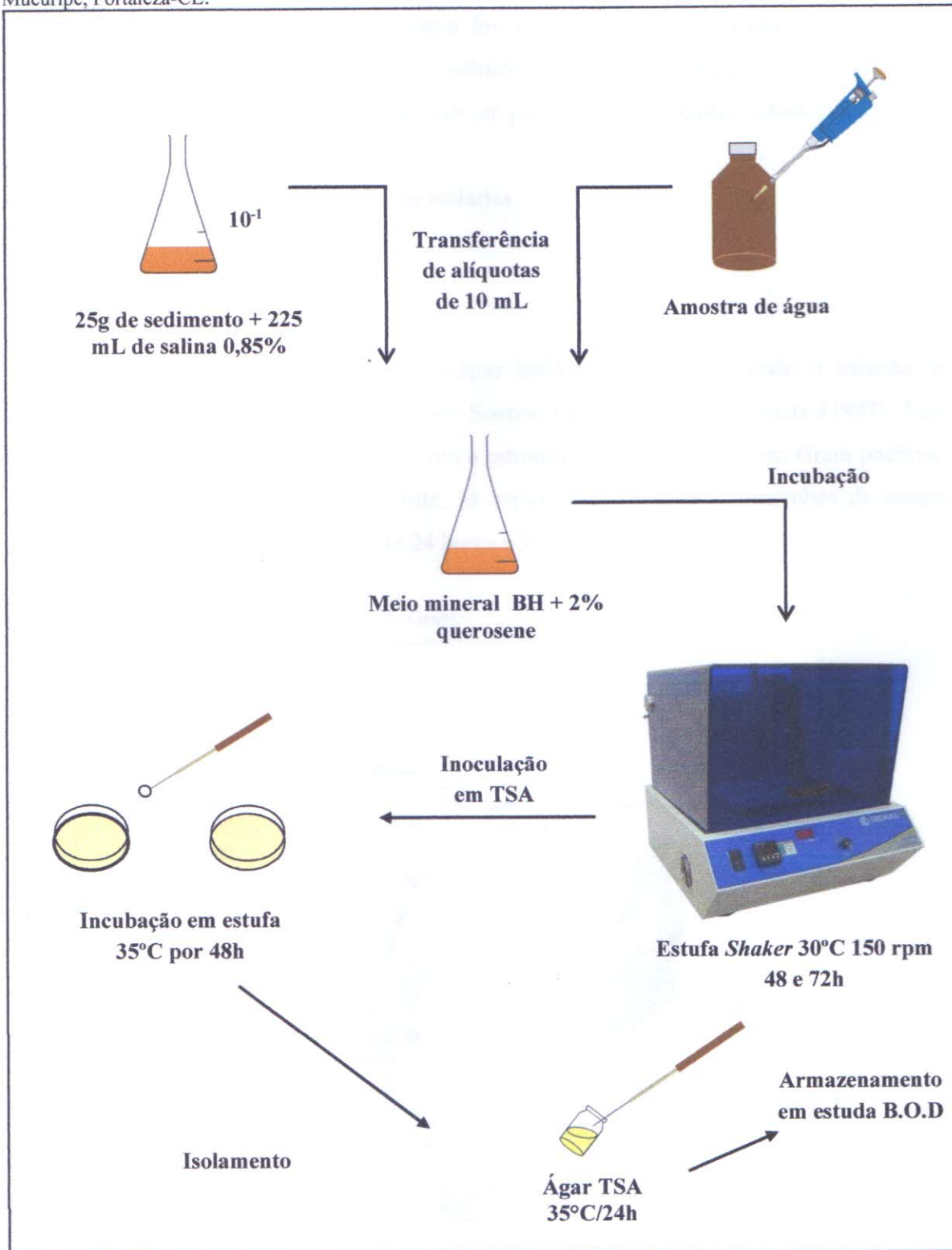
Após homogeneização manual, foi pesado 25g de cada amostra e transferida para um frasco de Erlenmeyer contendo 225 ml de solução salina na concentração de 0,85% de NaCl. O material foi mantido sob agitação magnética durante 30 minutos e após esse período, esperou-se 15 minutos para a precipitação do sedimento. Uma alíquota de 10 ml da suspensão foi retirada e transferida para outro Erlenmeyer contendo meio mineral Bushnell-Haas, acrescido de 2% (v/v) de querosene previamente esterilizado em membrana filtrante. Os

Erlenmeyers foram mantidos sob agitação de 150 rpm a 30°C. Repetiu-se o padrão de duas repetições para cada amostra descrito no item anterior utilizando os mesmos períodos de incubação.

4.5 Isolamento bacteriano

Após um período de 24 horas de incubação, dos frascos, foram retiradas alçadas de cultura bacteriana e estriadas em placas de Petri contendo o meio Ágar Triptona Soja – TSA (BBL) utilizando a técnica de esgotamento. As placas foram incubadas por 24 horas a 35°C. As colônias com morfologias diferentes foram isoladas e inoculadas em tubos contendo meio Ágar Triptona Soja – TSA (BBL) inclinado, que foram incubados por 24h a 35°C. Após 24 horas, os tubos contendo o crescimento bacteriano foram armazenados em estufas de B.O.D. a 20°C para posterior caracterização das cepas (Figura 7)

Figura 7 - Fluxograma do processamento das amostras isoladas de água e sedimento marinho do porto do Mucuripe, Fortaleza-CE.



4.6 Parâmetros físico-químicos

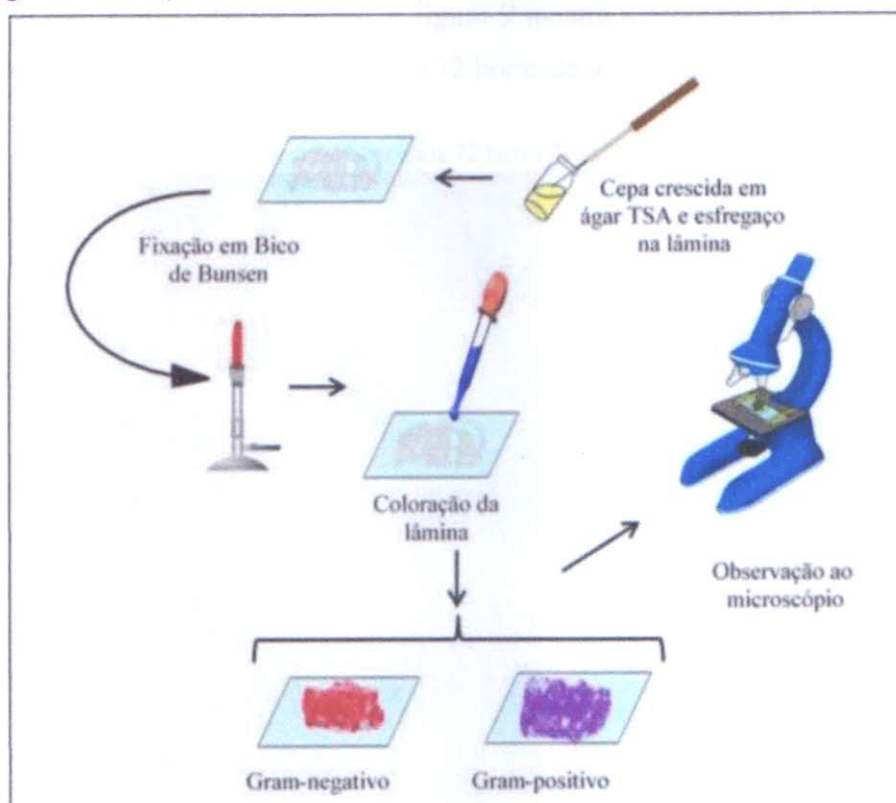
A temperatura das amostras de água foi medida no local de coleta utilizando uma sonda da marca Horiba. Em laboratório, a salinidade foi medida utilizando um refratômetro (Digit - 2011), enquanto o pH foi medido com um potenciômetro (Hanna instruments).

4.7 Caracterização fenotípica das cepas isoladas

4.7.1 Análise morfológica

A caracterização morfológica das cepas isoladas foi feita seguindo o método de coloração de Gram (Figura 8) descrito por Soares, Casimiro e Albuquerque (1987). Esta técnica diferencia as bactérias de acordo com a estrutura da parede celular em Gram positivas e negativas. Antes da realização do teste, as cepas foram renovadas em tubos de ensaio contendo ágar TSA e incubadas durante 24 horas a 35°C.

Figura 8 – Ilustração da técnica de coloração de Gram.



Fonte: SANTOS, 2013.

4.8 Avaliação da produção de biossurfactante

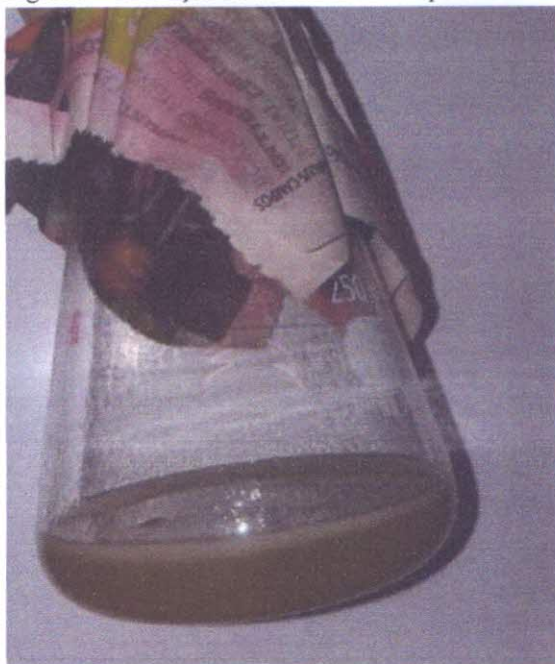
4.8.1 Inóculo bacteriano

A metodologia usada para o crescimento celular foi adaptada de Lima e Silva *et al.* (2010). Das cepas devidamente purificadas, foram retiradas alçadas de cultura bacteriana e inoculadas em Erlenmeyers contendo 50 ml de meio Lúria Bertani – LB (Difco) - (triptona 10g; extrato de levedura 5g; cloreto de sódio 10g; água destilada q.s.p 1000 ml; pH $7\pm 0,2$). Os frascos permaneceram incubados em estufa por 16 horas (*overnight*) a 35°C para obter um crescimento correspondente a 10^7 UFC/mL.

4.8.2 Produção de biossurfactantes

Após as 16 horas de incubação, foi retirado do inóculo bacteriano uma alíquota de 1 ml correspondente a concentração de 10^7 UFC/ml e transferido para Erlenmeyer contendo 100 ml do meio LB acrescido de 2% (v/v) de querosene. Os frascos permaneceram em agitação de 150 rpm a 30°C por 72 horas. A figura 9 mostra a produção do biossurfactante no meio LB enriquecido com querosene após as 72 horas de incubação.

Figura 9 – Produção de biossurfactante após 72 horas de agitação em meio Luria Bertani acrescido de querosene.

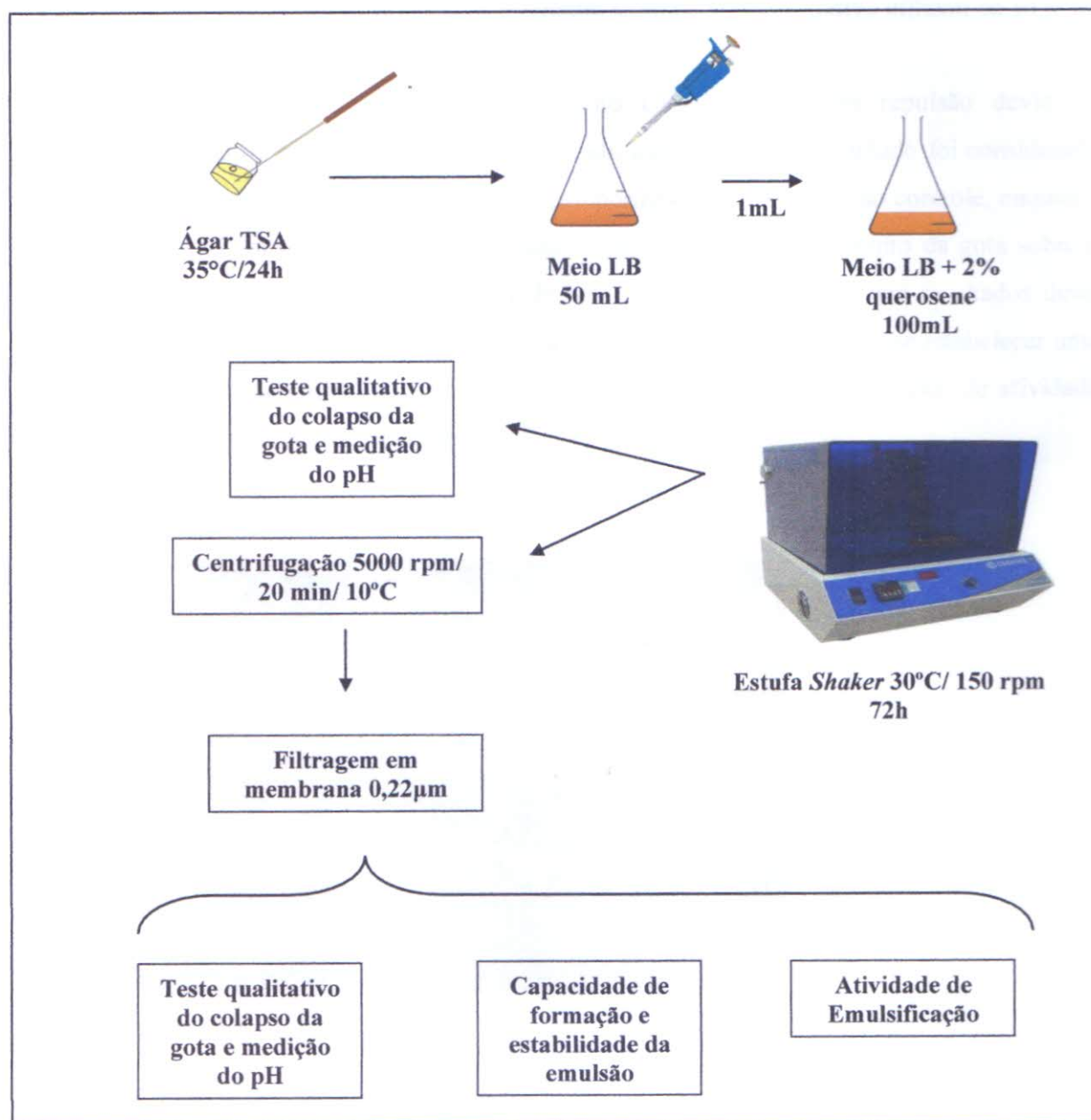


Fonte: Próprio autor.

4.8.3 Extração do líquido metabólico

Após as 72 horas de incubação, o líquido metabólico das cepas foi obtido por centrifugação do meio de cultura em tubos do tipo Falcon a uma velocidade de 1890 x g por 20 minutos a 10°C, seguido de esterilização em membranas filtrantes Millipore de 0,22 µm (Figura 10).

Figura 10 - Fluxograma do processo de produção de biossurfactante dos isolados do porto do Mucuripe, Fortaleza-CE.



4.8.4 Teste do colapso da gota

A capacidade dos isolados bacterianos de produzir biossurfactantes foi avaliada mediante o teste de colapso da gota, descrito por Bodour e Miller–Maier (1998). Para a realização do experimento uma placa contendo 96 poços rasos foi untada com óleo de motor Castrol 10W20 e deixados em repouso por 24 horas. Dos frascos que permaneceram em agitação por 72 horas (meio com células bacterianas) e do líquido metabólico (meio sem células) foi retirada uma alíquota de 10 μ l e dispensada nos poços, em triplicata. O espalhamento da gota foi avaliado após 1 minuto. Como controle negativo utilizou-se 10 μ l de água Milli-Q.

A gota de água ao entrar em contato com o óleo sofre repulsão devido à hidrofobicidade do hidrocarboneto, permanecendo assim, coesa. O resultado foi considerado negativo (Figura 11) quando a gota possuía comportamento semelhante ao controle, enquanto o resultado foi considerado positivo quando foi observado o espalhamento da gota sobre a superfície oleosa, indicando a produção de biossurfactantes. Baseado nos resultados deste teste, foi realizado um índice de atividade biossurfactante com objetivo de se estabelecer uma interpretação do desempenho das cepas no teste do colapso da gota. O índice de atividade biossurfactante está descrito na tabela 1.

Figura 11 –Teste do colapso da gota.



Fonte: Próprio autor.

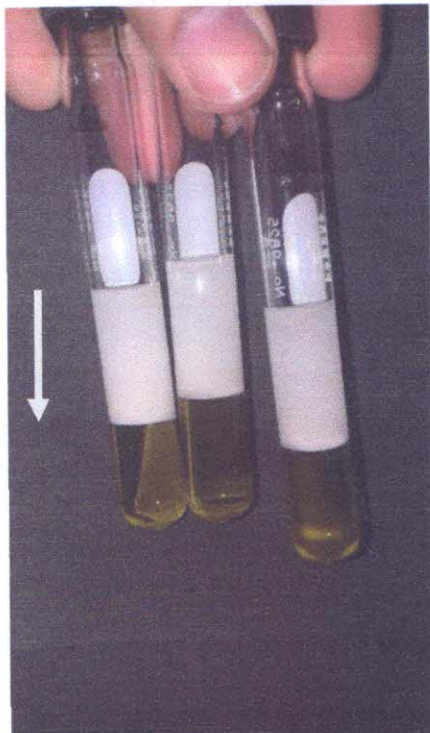
Tabela 1- Índice de atividade biossurfactante.

RESULTADOS POSSÍVEIS DO TESTE	ÍNDICE DE ATIVIDADE
(+) (+) (+)	Forte
(+) (+) (-)	Moderada
(+) (-) (-)	Fraca
(-) (-) (-)	Negativo

4.8.5 Volume de emulsificação

Para a medição do volume de emulsificação (VE) foi utilizada a metodologia proposta por Das, Das e Mukheryee (1998). Em tubos com tampa de baquelite (12 mm x 100 mm), foram adicionados 2 ml do líquido metabólico das cepas e 2 ml de compostos hidrofóbicos: querosene e n-hexadecano (SIGMA), em triplicata. Os tubos foram agitados por 2 minutos utilizando um agitador de tubos do tipo Vórtex (Biomixer Q-L 901) e deixados a temperatura ambiente por 2 minutos. Decorrido este tempo, mediu-se a altura da emulsão formada (Figura 12). Após 24 horas foi medida a altura da emulsão para obtenção do volume de emulsificação. Foram realizadas medições até 168 horas após o início do experimento a fim de determinar a estabilidade da emulsão. Foi utilizado o surfactante sintético Dodecil Sulfato de Sódio como controle positivo no teste. O volume da emulsão formado (VE%) foi estimado utilizando a fórmula 1. A estabilidade da emulsão (%ES) foi estimada a partir da fórmula 2 (FENNEMA, 1985), onde %VE_t corresponde ao volume de emulsão medida no tempo t e %VE₀ corresponde ao volume da emulsão medido no tempo zero (após os 2 minutos de agitação dos tubos). Foram consideradas boas emulsões aquelas que após 24 horas de formadas apresentassem volumes superiores a 40% (BOSCH *et al.*, 1998). Foram consideradas emulsões estáveis aquelas capazes de manter mais de 50% do seu volume original após 24 horas ou mais (WILLUMSEN e KARLSON, 1997). Neste trabalho, para a determinação da estabilidade das emulsões utilizou-se um tempo de observação de até 168 horas.

Figura 12 – Altura da emulsão formada (seta).



Fonte: Próprio autor.

$$VE (\%) = \frac{\text{altura da emulsão (mm)} \times \text{área da secção transversal (mm)}^2}{\text{volume total (=4000 mm}^3)} \times 100 \quad (1)$$

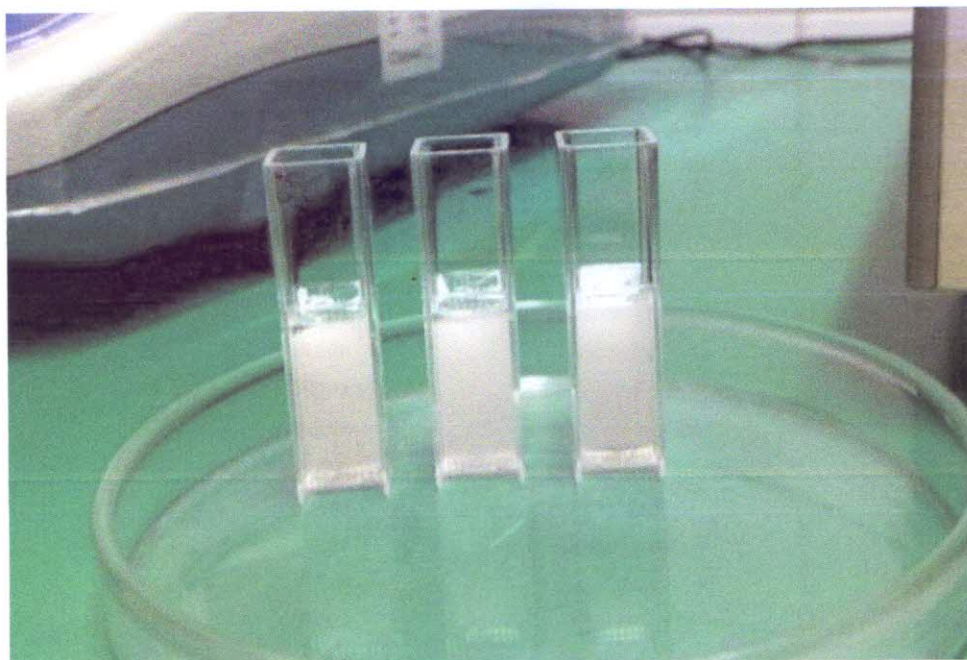
$$\% ES = \frac{\% VE_t}{\% VE_0} \times 100 \quad (2)$$

4.8.6 Atividade de emulsificação

A avaliação qualitativa da emulsão foi realizada utilizando a metodologia proposta por Cirigliano e Carman (1984). Em triplicata, foram adicionados em um tubo com tampa de baquetile 2 ml do líquido metabólico, 2 ml de tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 3) e 1 ml de n-hexadecano. Os tubos foram agitados por 2 minutos e deixados a temperatura ambiente por 10 minutos. Após isso, retirou-se, cuidadosamente, a emulsão formada (Figura 13) para a leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm. Foi utilizado como branco 2 ml do meio de cultura LB diluído em 2 ml de tampão de acetato de sódio acrescido de 1 ml do n-hexadecano. O surfactante SDS foi utilizado como controle positivo no teste. O valor de absorbância encontrado foi multiplicado por 2 e o resultado foi expresso em Unidade

de Atividade de Emulsificação (U.A.E.). Uma unidade de atividade de emulsificação corresponde a uma quantidade de emulsificante capaz de formar uma emulsão com absorvância de 1,0 em um comprimento de 540 nm (CIRIGLIANO E CARMAN, 1984).

Figura 13- Teste de atividade de emulsificação.



Fonte: Próprio autor.

4.8.7 Determinação do pH

Durante o processo de biodegradação de hidrocarbonetos pode ocorrer a alteração do pH do meio de cultivo devido à produção de metabólitos pelos micro-organismos. Diante disso, foram realizadas medições do pH das fermentações após as 72 horas e do líquido metabólico utilizando fitas de medição de pH (Macherey – Nagel).

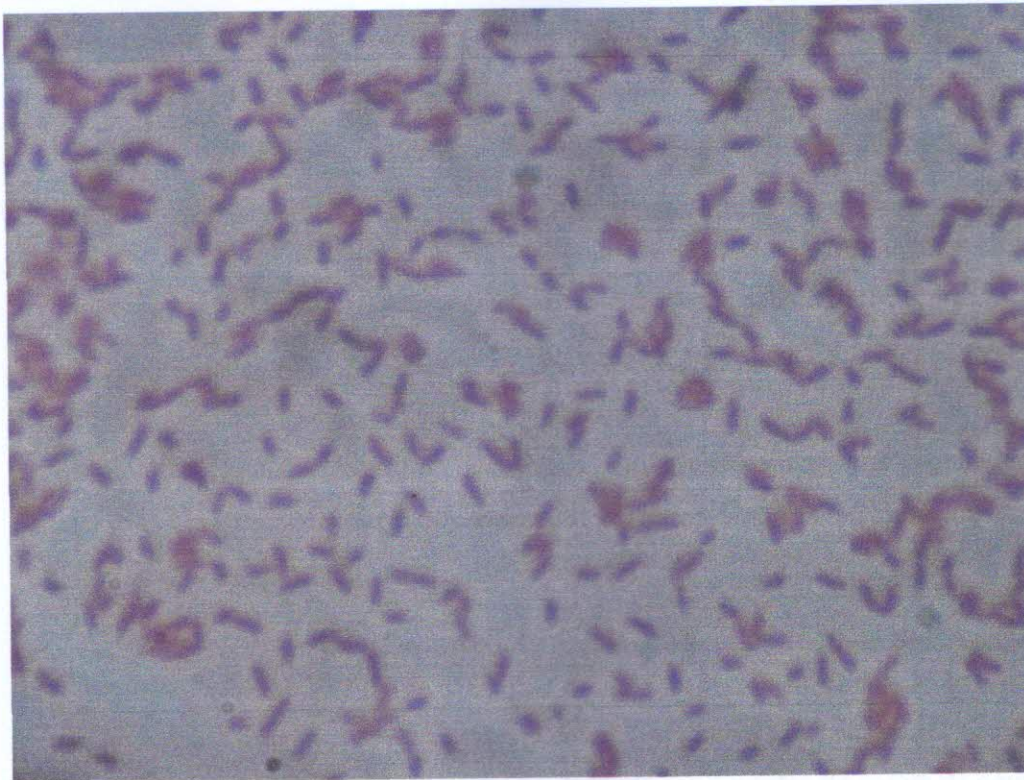
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 23 cepas das amostras de água e sedimento (Tabela 2). Vinte (20) cepas (87%) foram identificadas como bastonetes Gram negativos (Figura 14) e três cepas (13%) Gram positivas (Figura 15) sendo 1 coco e 2 bastonetes.

Tabela 2 - Características morfotintoriais das cepas isoladas do porto do Mucuripe, Fortaleza-CE.

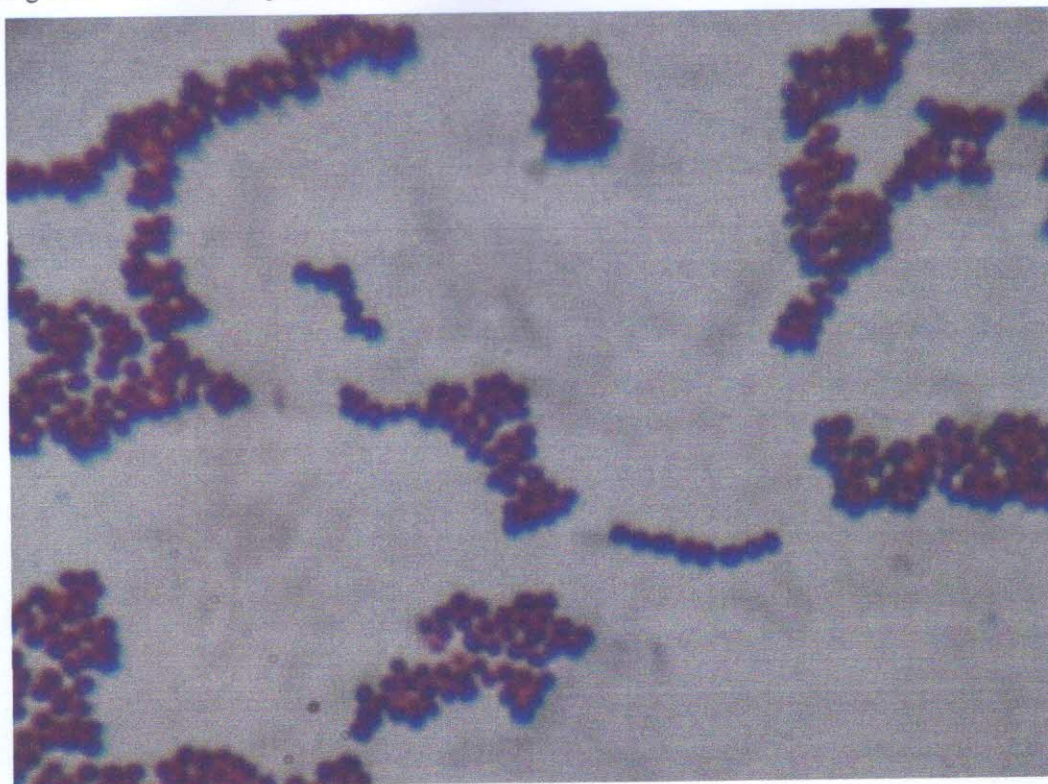
Cepas	Origem	Morfologia	Gram
1	Água	Bastonete	Negativo
2	Água	Bastonete	Negativo
3	Água	Bastonete	Positivo
4	Água	Bastonete	Negativo
5	Água	Bastonete	Negativo
6	Água	Bastonete	Negativo
7	Água	Bastonete	Negativo
8	Água	Bastonete	Negativo
9	Água	Bastonete	Negativo
10	Água	Bastonete	Negativo
11	Água	Bastonete	Negativo
12	Água	Cocos	Positivo
13	Água	Bastonete	Negativo
14	Água	Bastonete	Negativo
15	Sedimento	Bastonete	Negativo
16	Sedimento	Bastonete	Negativo
17	Sedimento	Bastonete	Negativo
18	Sedimento	Bastonete	Negativo
19	Sedimento	Bastonete	Negativo
20	Sedimento	Bastonete	Negativo
21	Sedimento	Bastonete	Positivo
22	Sedimento	Bastonete	Negativo
23	Sedimento	Bastonete	Negativo

Figura 14 - Bastonetes Gram negativos isolado do porto do Mucuripe, Fortaleza-CE.



Fonte: Próprio autor

Figura 15 – Cocos Gram positivos isolados do porto do Mucuripe, Fortaleza-CE.



Fonte: Próprio autor.

Jacobucci, Oriani e Durrant (2009) isolaram bactérias Gram negativas (*Pantoea agglomerans*) e positivas (*Planococcus citreus*) de solo contaminado por óleo cru próximo a uma refinaria em Campinas, São Paulo. Viramontes – Ramos *et al.* (2010) isolaram bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhodococcus* de solo contaminado por hidrocarboneto. Os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* tem sido amplamente citados na literatura como produtores de biossurfactantes (ACIOLY, 2009; PINTO; MARTINS; COSTA, 2009; SANTOS *et al.*, 2010; MAHJOUBI *et al.*, 2013; BEZERRA, 2012).

Grande parte das cepas isoladas na presente pesquisa foi caracterizada como Gram negativa. Segundo Bicca *et al.* (1999), em ambientes impactados por petróleo e derivados há uma maior frequência deste grupo bacteriano. Em ecossistemas aquáticos há predominância de bactérias Gram negativas (80%), enquanto bactérias Gram positivas representam cerca de 20% da população bacteriana nesses ambientes (ATLAS E BARTHA, 2002).

5.1 Parâmetros físico-químicos

Os resultados dos parâmetros físico-químicos dos pontos de coleta de água do porto do Mucuripe estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3- Parâmetros físico-químicos dos pontos de coleta de água do mar do porto do Mucuripe, Fortaleza - CE.

Pontos	pH	Salinidade	Temperatura (°C)
2	7,57	40	27,34
7	7,57	40	27,39
9	7,52	40	27,58
12	7,55	40	27,62
18	7,62	40	27,48
21	7,61	40	27,59
26	7,61	40	27,68
31	7,60	40	27,69
36	ND	40	27,74

ND: Não determinado.

O pH dos pontos de água estudados se manteve próximo à neutralidade, com valores entre 7,52 a 7,62. De acordo com Madigan, Martinko e Parker (2004), os micro-organismos possuem faixas específicas de pH onde seu crescimento é possível, apresentando, no entanto, um pH ótimo de crescimento. Grande parte dos micro-organismos possuem essa faixa de pH ótima próxima à 7 (BEZERRA, 2012). Portanto, o pH dos pontos de água estudados

encontravam-se dentro da faixa considerada ótima para o crescimento e desenvolvimento dos micro-organismos.

Todos os pontos avaliados apresentaram salinidade 40. Moreira (2013) ao avaliar a toxicidade do material dragado do porto do Mucuripe obteve valores de salinidade que variavam entre 35 a 38. Sabe-se que o aumento desta variável pode gerar efeitos deletérios aos micro-organismos (CASTRO, 2003). De acordo com Dash *et al.* (2013) bactérias marinhas são adaptadas à grande variação de pH e de outras variáveis abióticas como temperatura, salinidade e radiação.

Os pontos de água de superfície apresentaram variação de temperatura entre 27,34°C e 27,74°C. Esta variável ambiental possui grande influência no crescimento e sobrevivência dos micro-organismos. Com a elevação da temperatura há um aumento na velocidade das reações químicas e enzimáticas dos micro-organismos, até que se atinja a temperatura de desnaturação das células (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

No estudo realizado por Bezerra (2012), a temperatura foi o fator de maior influência na produção de biossurfactantes pela espécie *Pseudomonas aeruginosa*. Segundo o autor, uma variação de 10°C reduziu cerca de 19,27% a produção de biossurfactantes. Dasgupta, Ghosh e Sengupta (2013) isolaram três bactérias do gênero *Pseudomonas* que apresentaram crescimento similar em temperaturas variáveis de 20°C a 37°C. Contudo, as cepas tiveram um crescimento ótimo a 30°C. Souza (2012) ao avaliar a biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* constatou que os melhores resultados da atividade de emulsificação foram obtidos na temperatura de 28°C.

De acordo com Santos *et al.* (2010), os biossurfactantes apresentam bom desempenho em ambientes com altas temperaturas, pH e salinidade. Diante disso, possivelmente as condições ambientais além de influenciarem no metabolismo dos micro-organismos produtores de biossurfactantes, estão relacionadas também ao desempenho desses metabólitos na degradação e solubilização de derivados de petróleo.

5.2 Avaliação da produção de biossurfactantes

Das 23 cepas isoladas, 8 (34,7%) obtiveram resultados positivos no teste do colapso da gota, indicando forte atividade em ambos os meios (com e sem células bacterianas). Nove cepas (39,1%) não foram capazes de produzir biossurfactantes nos meios testados. A realização do teste do colapso da gota utilizando o meio contendo as células bacterianas e apenas os metabólitos das cepas possibilita verificar se o biossurfactante produzido

permanece aderido à parede celular ou é produto extracelular dos micro-organismos (PINTO; MARTINS; COSTA, 2009).

A produção de biossurfactante é evidenciada pelo espalhamento da gota dispensada sobre a superfície hidrofóbica. Esse colapso sofrido pela gota ocorre devido à redução da tensão interfacial entre o líquido e a superfície contendo o hidrocarboneto (SEN, 2010).

Três cepas (10, 21 e 22) apresentaram fraca atividade para a produção de biossurfactantes no meio com as células bacterianas e nenhuma atividade no líquido metabólico. Possivelmente os biossurfactantes permaneceram retidos na superfície celular destas cepas, fato evidenciado pelo resultado negativo no teste do colapso da gota com o líquido metabólico. Estas cepas também não produziram volumes de emulsão satisfatórios. Os resultados do teste do colapso da gota e atividade de emulsificação estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Resultados do teste qualitativo do colapso da gota e atividade de emulsificação das cepas isoladas da água do mar do porto do Mucuripe, Fortaleza-CE.

Cepa	COLAPSO DA GOTA		ATIVIDADE DE EMULSIFICAÇÃO (U.A.E.)
	Com células	Sem células	
1	+++	+++	2,02 ± 0,10
2	+++	+++	1,91 ± 0,70
3	+++	+++	1,95 ± 0,28
4	+++	+++	1,96 ± 0,09
5	+++	+++	2,07 ± 0,01
6	+++	+++	1,91 ± 0,23
7	+++	+++	1,90 ± 0,02
8	---	+--	1,34 ± 0,53
9	---	---	1,97 ± 0,12
10	+--	---	1,08 ± 0,23
11	+++	+++	0,76 ± 1,06
12	---	+--	1,89 ± 0,12
13	---	+--	1,82 ± 0,21
14	---	---	1,99 ± 0,06
15	---	---	0,32 ± 0,01
16	---	---	2,03 ± 0,10
17	---	---	1,99 ± 0,07
18	---	---	1,94 ± 0,06
19	---	---	1,89 ± 0,08
20	---	---	1,89 ± 0,01
21	+--	---	1,67 ± 0,07
22	+--	---	1,88 ± 0,08
23	---	---	1,87 ± 0,12
SDS 1mg/L	ND	ND	2,14 ± 0,10

+++ Forte atividade; ++ - Moderada atividade; + - - Fraca atividade; - - - Nenhuma atividade;
ND - Não determinado.

Maciel (2009) verificou que 83% dos isolados bacterianos de sedimento do manguezal no estado do Rio de Janeiro demonstraram capacidade de produzir biossurfactantes frente ao teste do colapso da gota. Viramontes – Ramos *et al.* (2010) isolaram cerca de 324 cepas bacterianas de solo contaminado por hidrocarboneto. Desse total, apenas 17 cepas tiveram resultados positivos para o teste do colapso da gota utilizando diferentes fontes de carbono (amido de milho, óleo de oliva, sacarose e parafina). As cepas produtoras de biossurfactantes

foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus* e *Bacillus*.

Na atual pesquisa, 21 cepas (91,3%) apresentaram valores acima de 1,0 unidade de atividade emulsificante (U.A.E.). Estes isolados foram capazes de produzir emulsão com qualidade utilizando n-hexadecano como composto hidrofóbico no teste de atividade emulsificante.

Sete cepas (1,4,5,9,14,16 e 17) apresentaram unidades de emulsificação acima de 1,95, enquanto quatorze cepas (2,3,6,7,8,10,12,13,18,19,20,21,22 e 23) atingiram valores entre 1 e 1,95. Os isolados na presente pesquisa apresentaram atividade emulsificante semelhantes ao encontrado por Thavasi, Sharma e Jayalakshmi (2011) para *Pseudomonas aeruginosa* (1,95 U.A.E) e *Bacillus subtilis* (entre 2 e 2,9 U.A.E) isolados de área portuária da Índia. As cepas 1, 5 e 16 apresentaram valores de U.A.E acima de 2 unidades de emulsificação. A máxima atividade emulsificante determinada foi de 2,07 obtida pela cepa 5.

As cepas que apresentaram forte atividade no teste do colapso da gota também obtiveram valores acima de 1,90 U.A.E, com exceção da cepa 11 que apresentou uma U.A.E. de 0,76. Esta cepa, mesmo apresentando resultado positivo no teste do colapso da gota não foi capaz de produzir emulsão com qualidade. Segundo Bezerra (2012) os compostos ativos de superfície produzidos por micro-organismos podem atuar de duas formas: reduzindo a tensão superficial na interface ar-água, apresentando características bio-surfactante; e/ou reduzir a tensão interfacial entre líquidos imiscíveis ou na interface sólido-líquido, mostrando propriedades emulsificantes. Portanto, provavelmente, os metabólitos da cepa 11 apresentam propriedades tensoativas, característica dos bio-surfactantes.

Parte dos isolados que obtiveram resultados negativos no teste do colapso da gota foram capazes de formar emulsões. Apesar deste dar indícios da capacidade dos bio-surfactantes em reduzirem a tensão superficial, é necessária a realização de um teste específico para determinar a redução da tensão superficial. De acordo com Karanth *et al.* (2014), todo bio-surfactante possui propriedades emulsificante, porém, nem todo emulsificante consegue reduzir a tensão superficial.

Segundo Pacwa-Plociniczak *et al.* (2011), os bio-surfactantes de baixa massa molecular são eficientes em reduzir a tensão superficial da água, mas não produzem emulsões eficientes. Por sua vez, os bio-surfactantes de alto peso molecular são bons agentes emulsificantes, mas não conseguem reduzir a tensão superficial significativamente. Portanto, possivelmente as cepas com fraca atividade no teste do colapso da gota, isoladas na presente pesquisa, foram capazes de produzir metabólitos com propriedade bioemulsificantes.

O surfactante SDS apresentou U.A.E. de $2,14 \pm 0,1$. Três cepas (1, 5 e 16) atingiram valores de U.A.E. próximo ao encontrado para o SDS, apresentando portanto, qualidade similar ao surfactante sintético.

Das 23 cepas isoladas, doze (52%) apresentaram volumes de emulsão acima de 40% na determinação com querosene, com máximo de 82% e mínimo de 60% até 24 horas. Estas cepas (1,2,3,4,5,6,7,15,17,19,20 e 23) foram capazes de produzir emulsões estáveis até as 168 horas de observação. Além destas, as cepas 9, 21 e 22 também apresentaram a mesma capacidade, apesar de produzirem volumes de emulsão inferiores a 40% (38%, 30% e 26%, respectivamente). Grande parte das cepas que não obtiveram nenhuma atividade no teste do colapso da gota também foram capazes de formar emulsões estáveis até 168 horas.

Na formação de emulsão utilizando n-hexadecano, 12 cepas (1,2,3,4,5,6,7,9,17,19,20 e 23) também apresentaram valores de emulsão acima de 40% até 24 horas, com máximo de 88% e mínimo de 58% para as cepas 1 e 23, respectivamente. Deste número, 10 cepas (1,2,3,4,5,6,7,9,19 e 23) apresentaram estabilidade superior a 50% até 168 horas no teste utilizando n-hexadecano. As cepas 17 e 20 que apresentaram estabilidade de 42% e 45%, respectivamente. Apesar da cepa 10 produzir volume de emulsão de 21%, obteve estabilidade de 58% até 168 horas, mostrando-se promissora.

A cepa 9 produziu emulsão de apenas 38% com querosene, porém, com n-hexadecano obteve volume de 70%, mostrando maior afinidade a esse hidrocarboneto. Por sua vez, a cepa 15 mostrou maior produção de emulsão com querosene (56%) do que com n-hexadecano (9%).

Os resultados da determinação do volume de emulsificação e estabilidade da emulsão estão expressos na tabela 5.

Tabela 5 – Volumes de emulsificação e estabilidade das emulsões produzidas pelas cepas isoladas do porto do Mucuripe, Fortaleza - CE.

Cepa	QUEROSENE		n-HEXADECANO	
	VOLUME DE EMULSIFICAÇÃO (%) – 24h	ESTABILIDADE DA EMULSÃO (%) - 168h	VOLUME DE EMULSIFICAÇÃO (%) – 24h	ESTABILIDADE DA EMULSÃO (%) - 168h
1	82	70	88	86
2	80	72	82	88
3	69	77	81	90
4	76	97	85	87
5	77	70	83	81
6	81	72	86	87
7	72	77	71	90
8	3	5	12	11
9	38	70	70	67
10	0	0	21	58
11	0	0	0	0
12	3	7	16	32
13	2	3	16	7
14	4	4	25	9
15	56	52	9	19
16	21	4	13	44
17	64	69	70	42
18	13	4	3	8
19	68	67	60	56
20	61	96	72	45
21	30	76	ND	ND
22	26	88	27	48
23	71	92	58	64
SDS 1 mg/L	84	82	80	85

ND – Não determinado

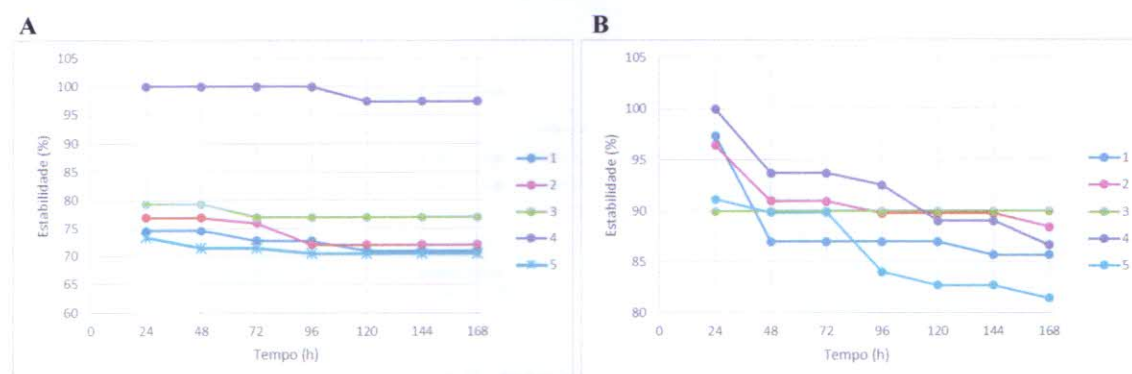
Quatro cepas (4, 20, 22 e 23) produziram metabólitos com estabilidade superior ao SDS para o querosene até as 168 horas de observação. Para o n-hexadecano, seis cepas (1,2,3,4,6 e 7) apresentaram essa mesma capacidade. No experimento realizado por Batista *et al.* (2006), mais de vinte cepas apresentaram estabilidade superior ao SDS até 48 horas. No presente trabalho, este surfactante apresentou volumes de emulsificação de 84% e 80% para querosene e n-hexadecano, respectivamente.

Bezerra (2012) obteve índices de emulsificação variando de 50 a 68% para o biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando manípueira como fonte de carbono. O biossurfactante produzido por essa bactéria apresentou boa estabilidade até 72 horas.

Das oito cepas que obtiveram resultados positivo no teste do colapso da gota (1,2,3,4,5,6,7 e 11), sete (1,2,3,4,5,6 e 7) foram capazes de produzir emulsões estáveis até as 168 horas, indicando um elevado potencial em produzir metabólitos com propriedades tensoativas e/ou emulsificantes.

A cepa 4 obteve estabilidade de 97% para querosene até as 168 horas de estudo (Gráfico 1). Este foi o maior valor de estabilidade encontrado dentre as cepas testadas com este hidrocarboneto. Entretanto, na determinação com n-hexadecano, esta cepa obteve estabilidade de 87% até as 168 horas.

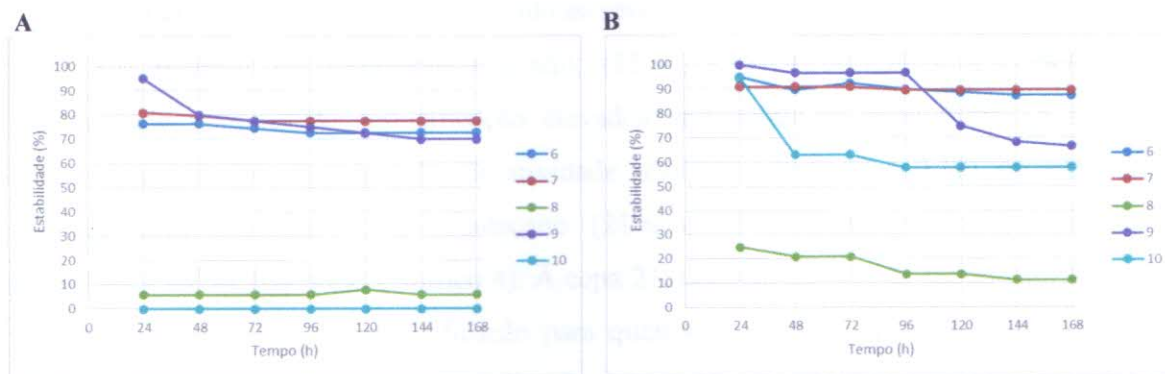
Gráfico 1 – Estabilidade da emulsão (%) das cepas 1,2,3,4 e 5.



Legenda: A- experimento com querosene; B- experimento com n-hexadecano.

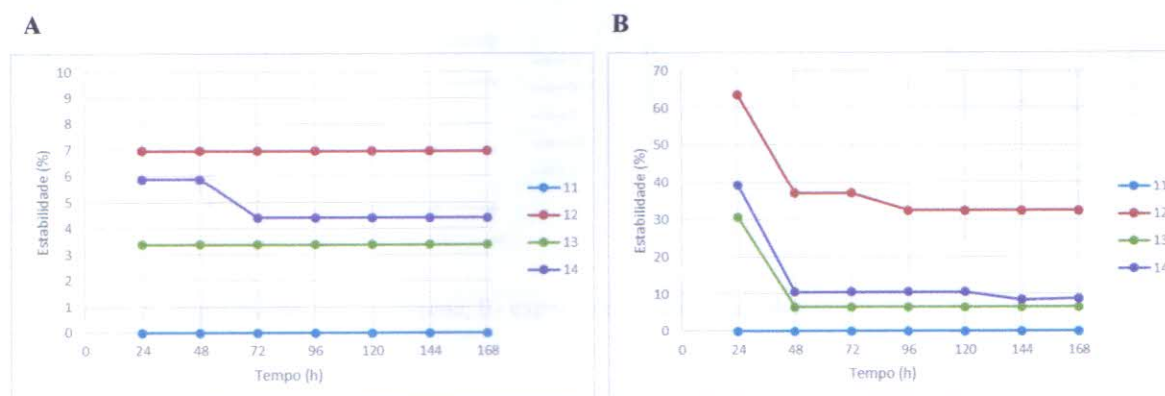
Duas cepas não foram capazes de produzir emulsões com querosene (10 e 11). Entretanto, os metabólitos produzidos pela cepa 10 apresentaram boa estabilidade com n-hexadecano até 168 horas, mesmo produzindo uma emulsão de apenas 21%. Esta cepa obteve valor de 1,08 U.A.E. no teste de atividade emulsificante e conseguiu estabilizar mais de 50% da emulsão original formada na presença de n-hexadecano (Gráfico 2). A cepa 11 não foi capaz de formar emulsão na presença de n-hexadecano (Gráfico 3).

Gráfico 2 – Estabilidade da emulsão (%) das cepas 6,7,8,9 e 10.



Legenda: A- experimento com querosene; B- experimento com n-hexadecano.

Gráfico 3 – Estabilidade da emulsão (%) das cepas 11,12,13,14.



Legenda: A- experimento com querosene; B- experimento com n-hexadecano.

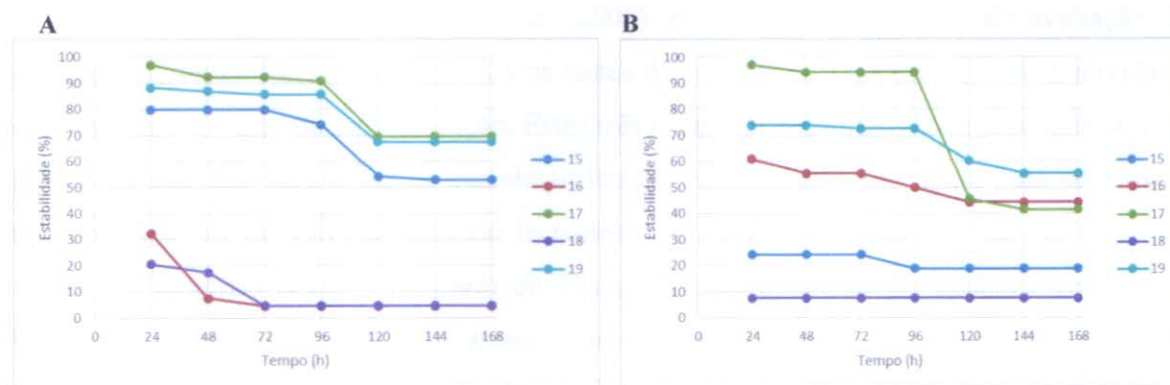
Oito cepas (8,9,12,14,16,18,21 e 22) produziram volumes de emulsão inferiores a 40% utilizando o querosene como composto hidrofóbico. Entretanto, desse total, as cepas 9, 21 e 22 mesmo apresentando baixos volumes de emulsão na presença de querosene foram capazes de estabilizar mais de 50% da emulsão original, mostrando-se promissoras. Para o n-hexadecano, um total de 9 cepas (8,10,12,13,14,15,16,18 e 22) apresentaram valores de emulsão abaixo de 40%. Viramontes – Ramos *et al.* (2010) estimaram índices entre 61-100% utilizando querosene como fonte de carbono.

Vale salientar que as cepas isoladas das amostras de água apresentaram maiores volumes de emulsificação do que os isolados de sedimento. Este fato pode estar relacionado com as atividades de dragagem do porto iniciadas em 2010. Possivelmente, parte das bactérias

já adaptadas às frações de hidrocarbonetos presentes neste sedimento permaneceu suspensa na coluna d'água no momento da coleta devido ao revolvimento de fundo.

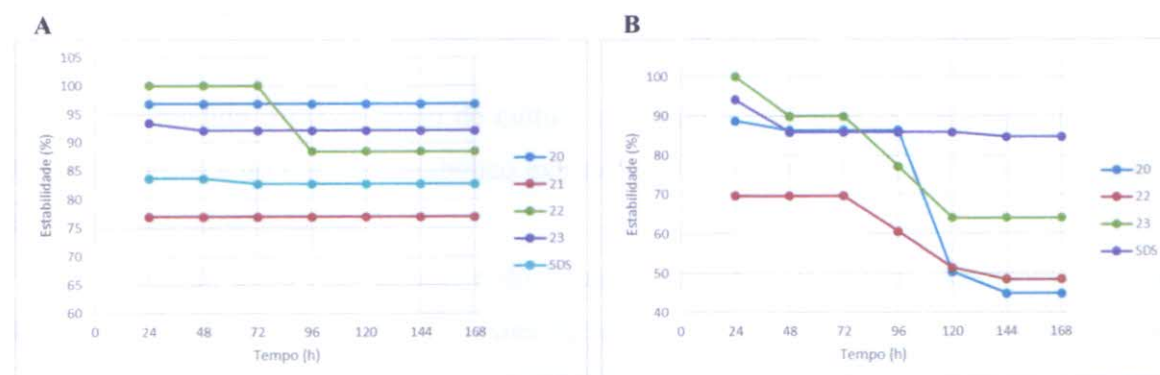
Os isolados do sedimento marinho, (15,16,17,18,19,20,21,22 e 23) mesmo não apresentando volumes de emulsificação elevados, mostraram-se promissores. A cepa 16, apesar de apresentar elevado valor de atividade emulsificante ($2,03 \pm 0,10$), produziu fraca emulsão com querosene e n-hexadecano (21% e 13%, respectivamente) com baixa estabilidade até as 168 horas (Gráfico 4). A cepa 21, também isolada de sedimento, apesar de produzir baixo volume de emulsificação para querosene (30%), conseguiu manter mais de 70% da emulsão até as 168 horas de realização do teste (Gráfico 5), mostrando-se promissora.

Gráfico 4 – Estabilidade da emulsão (%) das cepas 15,16,17,18 e 19:



Legenda: A- experimento com querosene; B- experimento com n-hexadecano.

Gráfico 5 – Estabilidade da emulsão (%) das cepas 20,21,22,23 e do surfactante sintético SDS.



Legenda: A- experimento com querosene; B- experimento com n-hexadecano.

Ambientes impactados por petróleo e derivados exercem pressão seletiva sobre a microbiota local, selecionando os organismos com maior capacidade de adaptação e/ou degradação de tais substâncias.

Moreira (2013) ao avaliar o risco toxicológico do sedimento dragado do porto do Mucuripe constatou que as zonas mais abrigadas do porto promovem a deposição de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e hidrocarbonetos alifáticos (HA). Entretanto, ao analisar a quantidade destes compostos, o autor concluiu que as concentrações existentes são inferiores quando comparadas aos outros portos no país.

Para Santos *et al.* (2010) locais contaminados por hidrocarbonetos selecionam os micro-organismos capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono. Possivelmente as cepas produtoras de biossurfactantes isoladas do porto do Mucuripe já estão adaptadas à fração de hidrocarbonetos presentes na área.

Silva *et al.* (2010) avaliaram a produção de biossurfactantes de bactérias isoladas de manguezal no estado do Rio de Janeiro usando unicamente o teste do colapso da gota como parâmetro de avaliação. Já Satpute *et al.* (2008) utilizaram oito métodos de avaliação da produção de biossurfactantes, incluindo os testes de colapso da gota (modificado), atividade emulsificante e índice de emulsificação. Estes três testes apresentaram resultados satisfatórios indicando que tais metodologias quando utilizadas em conjunto são aptas para selecionar micro-organismos produtores de biossurfactantes.

As bactérias isoladas do porto do Mucuripe com potencial em produzir compostos biossurfactantes e/ou bioemulsificantes poderão ser utilizadas em casos de possíveis derramamentos de petróleo e derivados, reduzindo os impactos ambientais provenientes destes acidentes.

5.3 pH das fermentações

Foi medido o pH do meio de cultura contendo o crescimento bacteriano após as 72 horas de estudo e do líquido metabólico extraído posteriormente. Os resultados das medições estão apresentados na tabela 6.

O pH do meio com células e do líquido metabólico indicaram condições alcalinas. Barbosa e Paz (2007), ao cultivar *Chromobacterium violaceum* em meio de cultivo contendo óleo de pequi como fonte de carbono, verificaram que até 60 horas de fermentação o pH do meio com células e do líquido metabólico apresentaram-se levemente alcalinos (pH 8).

Tabela 6 – Valores de pH dos inóculos crescidos em meio LB (meio com células) e do líquido metabólico das cepas (meio sem células).

Cepa	pH		Cepa	pH	
	Meio com células	Meio sem células		Meio com células	Meio sem células
1	8	8,5	13	8	9
2	ND	9	14	8	9
3	8	8	15	8	8
4	8	8,5	16	8	9
5	ND	9	17	8	8
6	ND	9	18	8	9
7	8	8	19	8	8
8	8	8,5	20	8	8
9	8	9	21	ND	9
10	8	9	22	ND	9
11	8	8	23	8	8
12	8	9			

ND – Não determinado.

Lima e Silva *et al.* (2010) ao estudar o biossurfactante produzido por *Pseudomonas fluorescens* utilizando milhocina como fonte de carbono, verificou que no fim das 96 horas de fermentação, o pH do meio de cultivo atingiu valor de 8,5. Possivelmente, a elevação do pH do meio estava relacionada com o consumo da fonte de nitrogênio proveniente da fonte de carbono usada.

Piróllo (2008) avaliou a capacidade de degradação de diferentes hidrocarbonetos por *Pseudomonas aeruginosa*. No teste utilizando o querosene, o pH do meio de cultura aumentou de 6,8 para 7,9, enquanto com o óleo diesel o pH atingiu valores acima de 8. De acordo com a autora, o aumento do pH em ambos os substratos ocorreu devido a autólise celular. Segundo Faria (2010) este fenômeno é normalmente observado em fungos e ocorre devido a produção de amônio no meio de cultura por conta da redução da fonte de carbono. Possivelmente, na presente pesquisa, as cepas foram capazes de utilizar todo o querosene no meio de cultura durante a produção de biossurfactantes, ocasionando a autólise celular das cepas devido à redução da fonte de carbono.

Entretanto, Silva (2012) verificou que durante a biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano misto o pH se manteve na faixa de neutro a levemente ácido (7,0 a 5,7). De acordo com Kumar *et al.* (2005) a acidificação do meio de cultura durante as fermentações ocorre devido a formação de metabólitos ácidos durante a degradação do petroderivado.

6 CONCLUSÕES

- Foi possível isolar cepas do porto do Mucuripe com capacidade de produzir biossurfactantes a partir de querosene.
- Os isolados foram capazes de formar emulsões e mantê-las estáveis por até 168 horas, evidenciando um elevado potencial biotecnológico.
- As cepas selecionadas possuem potencial para serem utilizadas em processos de biorremediação de compostos hidrocarbonados, reduzindo os impactos ambientais provenientes de derramamentos de petróleo e/ou derivados.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Micro-organismos com capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo possuem elevado interesse biotecnológico. Espera-se, com a continuidade deste trabalho, identificar as cepas com potencial em produzir biossurfactantes a fim de gerar conhecimento a respeito da diversidade da microbiota marinha na região.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA. **Atlas de energia elétrica do Brasil** 3.ed – Brasília, 2008. p.263.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Total petroleum hydrocarbons**. 1999. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp.asp?id=424&tid=75>>. Acesso em: 23 Jan. 2014.
- AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE. **Fate of spilled oil in marine waters: Where does it go? What does it do? How do dispersants affect it?** API Publication Number 4691, USA, 1999. 43 p.
- ANDRADE, J.A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I.C.S.F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética Química.**, Araraquara, v.35, n.3, p. 17-43, 2010.
- ATLAS, R.M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiological Reviews.**, Washington, v. 45, n. 1, p. 180-209, 1981.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Ecología microbiana y microbiología ambiental**. 4. ed Madrid : Pearson Educación, 2002. 696 p.
- BALBA, M.T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal of Microbiological Methods.**, Amsterdam v. 32, n. 2, p. 155-164, 1998.
- BARBOSA, M.M.C.; PAZ, M.C.F. Produção de biossurfactantes por *Chromobacterium violaceum* utilizando como substrato óleo vegetal (óleo de pequi). In: Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Nordeste de Educação Tecnológica, 2., 2007, João Pessoa. **Anais...**, João Pessoa: Rede Federal de Educação Profissional, Científica e Tecnológica, 2007. Disponível em: <http://www.redenet.edu.br/publicacoes/arquivos/20080220_100611_MEIO-136.pdf>. Acesso em 22 Maio 2014.
- BATISTA, S.B. *et al.* Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**, New York, v.97, p. 868-875, 2006.
- BEZERRA, M. S. **Estudo da produção de biossurfactantes sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GVIA utilizando manipueira como fonte de carbono**. 2012. 153 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.
- BICCA, F.C.; FLECK, L.C.; AYUB, M.A.Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 231-236, Jul./Sep. 1999.
- BODOUR, A.A.; MILLER-MAIER, R.M. Application of a modified drop collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods.**, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 273-280, May. 1998.

BONONI, V.L.R. *et al.* In: **Microbiologia ambiental**, Eds.: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. 2^a ed. Embrapa. Jaguariúna, 2008.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**., New York, v. 74, n. 1, p. 63–67, Aug. 2000.

BOSCH, M. P. *et al.* Surface-active compounds on microbial cultures. **Tenside Surfactants Detergents**., [S.l.] v. 25, p. 208–211, 1988.

BOTELHO, A. L. **Análise da contaminação por óleo na APA de Guapimirim – RJ Aspectos Geoquímicos e socio-ambientais**. 2003. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Instituto de Geociências, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2003.

BRITO, G. C. B. *et al.* A importância da bioprospecção de microrganismos em áreas contaminadas com produtos derivados do petróleo. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**., Maringá, v. 3, n. 3, p. 291-310, 2010.

BRUNO, A.P.V. **Poluição por petróleo nos ambientes marinho e costeiro**. 2006. 29 p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Centro Universitário Augusto Motta (UNISSUAM), Rio de Janeiro, 2006.

CATTER, K.M. **Diversidade bacteriana em mangues e seu potencial na degradação de petróleo e de alguns de seus derivados**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

CARDOSO, A.M. Bioprospecção de novos genes para a indústria usando metagenoma e bioinformática. **Acta Scientiae & Technicae**., Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p.23-30, fev. 2013.

CASTRO, H. M. P. **Efeito da radiação solar e da salinidade sobre o crescimento de *Escherichia coli***. 2003.51 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

CERQUEIRA, V.S. *et al.* Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. **World Journal Microbiol and Biotechnololy**., Netherlands, v. 28, n. 3, p. 1203-1222, 2011.

CHAGAS – SPINELLI, A.C.O. *et al.* Biorremediation of tropical soil contaminated with diesel oil. **Journal of Environmental Management**., London, v. 113, p. 510-516, 2012.

CIRIGLIANO, M.C.; CARMAN, G.M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**., Washington, v. 48, n. 4, p. 747-750, Oct. 1984.

COLLA, L.M. *et al.* Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciência e Agrotecnologia**., Lavras, v. 32, n. 3, p. 809-813, 2008.

CRAPEZ, M. A. *et al.* Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, vol. 30, n. 179, p. 32-37, 2002.

DAS, M.; DAS, S.K.; MUKHERJEE, R.K. Surface active properties of the culture filtrates of a *Micrococcus* species grown on n-alkanes and sugars. **Bioresource Technology**, New York, v. 63, n. 3, p. 231-235, Mar. 1998.

DASGUPTA, D.; GHOSH, R.; SENGUPTA, T. Biofilme mediated enhanced crude oil degradation by newly isolated *Pseudomonas* species. **ISRN Biotechnology**, Cairo, v. 2013, p. 1-13, 2013.

DASH, H. R. *et al.* Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**., Berlin, v. 97, p. 561-571, 2013.

FARIA, R.A. **Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por *Ceriporiopsis subvermispota***. 2010. 102 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. 2. ed. New York: Food science and technology, 1985. 991p.

FERNANDES, R. **Modelação de Derrames de Hidrocarbonetos**. 2001. 124p. Trabalho Final de Curso - Relatório Final (Licenciatura em Engenharia do Ambiente) - Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2001.

FUNDAÇÃO CEARENSE DE PESQUISA E CULTURA. **Projeto do Plano Básico Ambiental da Obra de Aprofundamento do Porto (Contrato nº041/2010 Companhia Docas do Ceará – CDC/ UFC-LABOMAR/FCPC e Secretaria Especial de Portos – SEP): Relatório de Monitoramento das águas oceânicas e bacia de evolução**. Fortaleza, 2012.

GANDRA, M.S. **Efeitos do petróleo sobre a associação de macroinvertebrados bentônicos de praias arenosas do extremo sul do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica)- Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2005.

GAYLARDE, C. C, BELLINASSO, M. L., MANFIO, G. P. Biorremediação: aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. **Biotechnology Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 34, p. 36-43, jan./jun. 2005.

GIACOBO, F. *et al.* **Pesquisas e estudos para a logística portuária e desenvolvimento de instrumentos de apoio ao planejamento portuário: plano de mestre - Porto do Mucuripe**. Florianópolis: Secretaria de Portos da Presidência da República; Universidade Federal de Santa Catarina; Fundação de Ensino de Engenharia de Santa Catarina; Laboratório de Transportes e Logística, 2012.

GOMES, E.B. *et al.* Biodegradation of stored jet fuel by a *Nocardia sp.* isolated from contaminated soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**., Curitiba, v. 52, n. 5, p. 1279-1284, Sept./Oct. 2009.

GOUVEIA, E.R. *et al.* Bactérias produtoras de biossurfactantes: produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de poços de petróleo. **Revista Biotechnology Ciência e Desenvolvimento**., Brasília, n. 30, p. 39-45, jan./jun. 2003.

HEXADECANO: produto químico líquido. Empresa responsável Merck/SA-Brasil. Cotia, SP: 2005. Ficha de informações de segurança de produtos químicos.

JACOBUCCI, D.F.C.; ORIANI, M.R.G.; DURRANT, L.R. Reducing COD level on oily effluent by utilizing biosurfactant-producing bacteria. **Brazilian Archives of Biology And Technology**., Curitiba, v. 52, n. 4, p. 1037-1042, July/Aug. 2009.

JOEL, O.F.; AMAJUOYI, C.A. Physicochemical characteristics and microbial quality of an oil polluted site in Gokana, rivers state. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**., Port Harcourt, v. 13, n. 3, p. 99-103, Sept. 2009.

JUWARKAR, A.A.; SINGH, S.K.; MUDHOO, A. A comprehensive overview of elements in bioremediation. **Reviews in Environmental Science Biotechnology**, Netherlands, v. 9, p. 215-288, 2010.

KARANTH, N.G.K., DEO, P.G., VEENANADIG, N.K. **Microbial production of biosurfactant and their importance**. India Instituto of Science. Disponível em: <<http://www.iisc.ernet.in/currensci/jul10/articles19.htm>>. Acesso em: 22 Maio 2014.

KIM, I. Ten years after the enactment of the Oil Pollution Act of 1990: a success or a failure. **Marine Policy**., Oxford, v. 26, n. 3, p. 197-207, May. 2002.

KUMAR, A.; KUMAR, S.; KUMAR, S. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using MTCC 1194. **Biochemical Engineering Journal**., Amsterdã, v. 22, n. 2, p. 151-159, 2005.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiology reviews**., Whashington, v. 54, p. 305-315, 1990.

LIMA E SILVA, T. A. *et al.* Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milhocina como substrato. **Exacta**, São Paulo, v. 8, n.1, p. 19-26, 2010.

LOPES, C. F.; MILANELLI, J. C. C.; POFFO, I. R. F. **Ambientes costeiros contaminados por petróleo: procedimentos de limpeza – manual de instrução**. São Paulo : Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2007. p.120.

LOPES, B.M.M. **Avaliação da contaminação por hidrocarbonetos de petróleo em mexilhões *Mytilus galloprovincialis* da costa sul de Portugal. O sistema MFO como biomarcador de contaminação**. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologias do Ambiente) - Universidade do Algarve, Faro, 2009.

LOPES, M.A.; NASS, L.L.; MELO, I.S.; Bioprospecção: biotecnologia aplicada à prospecção e uso de serviços e funções da biodiversidade. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**., Brasília, n. 34, p. 29-35, jan. /jun. 2005.

MACIEL, A. B. **Isolamento de bactérias degradadoras de petróleo e produtoras de biossurfactantes a partir do sedimento do manguezal rio Paraíba do Sul – Rio de Janeiro**. 2009. 45p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darci Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2009.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 608 p.

MAHJOUBI, M. *et al.* Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites in Tunisia: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. **New Biotechnology**., Netherlands, v. 00, p. 1-11, Apr. 2013.

MARIANO, A.P. ; ANGELIS, D.F. ; BONOTTO, D.M. Monitoramento de indicadores geoquímicos e avaliação de biodegradação em área contaminada com óleo diesel. **Engenharia Sanitária e Ambiental**., Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 296-304, 2007.

MOREIRA, L. B. **Avaliação de risco ecológico da contaminação de sedimentos e material dragado na região do porto do Mucuripe – Ceará através de métodos ecotoxicológicos**. 2013. 153 f. Tese (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

NATURES WAY GREEN. **What is bioremediation?** Disponível em : <<http://www.natureswaygreen.com/bioremediation.htm>>. Acesso em: 18 Maio 2014.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**., São Paulo , v.25, p. 772-776, 2002.

PACWA-PLOCINICZAK, M. *et al.* Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **Internacional Journal of Molecular Sciences**., Switzerland, v. 12, p. 633-654, 2011.

PEDROZO, *et al.* **Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo**. Salvador: Centro de Recursos Ambientais, 2002. 246 p.

PEPPER, I.L.; GERBA, C.P.; BRUSSEAU, M.L. **Environmental and pollution science**. 2nd ed. - Amsterdam; Boston: Academic Press, 2006. 532p.

PINHEIRO, L.C. **Avaliação do efeito de um derrame de óleo sobre a macrofauna bentônica de espriamento das ondas na Praia de Tramandaí-RS**. 2012. 35f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas com ênfase em biologia marinha e costeira) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul , Imbé, 2012.

PINTO, M. H.; MARTINS, R.G.; COSTA, J. A. V. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Química Nova**., São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2104-2108, 2009.

PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas na área de Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

QUEROSENE: produto químico líquido. Empresa responsável: Casquímica Produtos Químicos Ltda. Diadema, SP: 2008. Ficha de informação de segurança de produtos químicos.

REID, B.J.; JONES, K.C.; SEMPLE, K.T. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments: a perspective on mechanisms, consequences and assessment. **Environmental pollution**., Barking, v. 108, p. 103-112, 2000.

SANTOS, D.R. **Bioprospecção e avaliação do potencial biotecnológico de bactérias degradadoras de agrotóxicos isoladas do rio Pacotí-CE.** 2013. 56f. Monografia (Graduação em Ciências Ambientais) – Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

SANTOS, S. *et al.* Evaluation of substrates from renewable-resources in biosurfactants production by *Pseudomonas* strains. **African Journal of Biotechnology.**, Kenya, v. 9, n. 35, p. 5704-5711, Aug. 2010.

SATPUTE, S. K. *et al.* Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. **Indian Journal of Marine Sciences.**, India, v. 37, n.3, p. 243-250, Sept. 2008.

SEN, R. *et al.* (Edit). **Biossurfactantes.** USA, Springer, 2010. 359p.

SILVA, A.M.F.D. *et al.* Degradação de petróleo e produção de biossurfactante por bactérias isoladas a partir de sedimento de um manguezal do Estado do Rio de Janeiro. In: Congresso Brasileiro de Oceanografia, 3, Rio Grande do Sul. **Anais...**, Rio Grande do Sul, Associação Brasileira de Oceanografia, 2010. p. 03436 – 03439.

SILVA, D.S.P. **Degradação de óleo diesel por consórcio microbiano misto isolado de ambiente poluído.** 2012. 98f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

SINGH, S. *et al.* Bioremediation: environmental clean-up through pathway engineering. **Current Opinion in Biotechnology.**, London, v. 19, p. 437– 444, 2008.

SOARES, J.B., CASIMIRO, A.R.S., ALBUQUERQUE, L.M.B. **Microbiologia Básica.** Fortaleza: Edições UFC, 1987.

SOUZA, F.A.S.D. **Biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* em água do mar.** 2012. 158f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2012.

SYNNE, M. Bioprospecting of organisms from the deep sea: scientific and environmental aspects. **Clean Technologies and Environmental Policy.**, Germany, v. 9, p. 53-59, 2007.

TEIXEIRA, V. L. *et al.* **Caracterização do Estado da Arte em Biotecnologia Marinha no Brasil.** Brasília: Ministério da Saúde; Ministério de Ciência e Tecnologia; Organização Pan-Americana de Saúde, 2010. 134 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

THAVASI, R.; SHARMA, S.; JAYALAKSHMI, S. Evaluation of screening methods for the isolation biosurfactant producing marine bacteria, **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology.**, Los Angeles, S1:001, p. 1-6, 2011.

VALOIS, A.C.C; OLIVEIRA, M.R.V. Segurança biológica para o agronegócio. **Agrociencia.**, México, v.4, p. 203-211, 2005.

VIRAMONTES-RAMOS S. *et al.* Selection of biosurfactan/bioemulsifier-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated soil. **Brazilian Journal of Microbiology.**, São Paulo, v. 41, p. 668-675, 2010.

WETLER-TONINI, R.M.C.; REZENDE, C.E.; GRATIVO, A.D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis.**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 4, p.1010-1020, dez. 2010.

WILLUMSEN, P.A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation.**, Dordrecht, v. 7, n. 5, p. 415-423, Oct. 1997.

WOLICKA, D. *et al.* Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. **Bioresource Technology.**, New York, v. 100, p. 3221-3227, 2009.