

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

LIDIANNE LEAL ROCHA

**ESTUDO DE COMUNIDADES BACTERIANAS DE SOLOS DO
MANGUEZAL DA BARRA GRANDE, ICAPUI-CE E SELEÇÃO DE CEPAS
COM POTENCIAL PARA DEGRADAR HIDROCARBONETOS**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. VÂNIA MARIA MACIEL MELO

FORTALEZA - CE

2008

Lidiane Leal Rocha

Estudo de comunidades bacterianas de solos do manguezal da Barra Grande,
Icapui-CE e seleção de cepas com potencial para degradar hidrocarbonetos

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo

Fortaleza

2008

R574e Rocha, Lidianne Leal

Estudo de comunidades bacterianas de solos do manguezal da Barra Grande, Icapui-CE e seleção de cepas com potencial para degradar hidrocarbonetos / Lidianne Leal Rocha, 2008.

87f.; il. color. Enc


Orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo

Área de concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos
Dissertação Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Fortaleza, 2008.

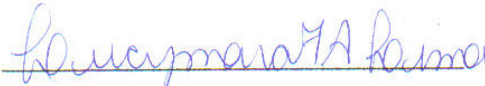
1. Manguezal 2. Petróleo 3. n-Hexadecano 4. T-RFLP I. Melo, Vânia Maria Maciel (Orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Instituto de Ciências do Mar III. Título

CDD 570

Após a finalização dos trabalhos da defesa de Dissertação de Mestrado da aluna, **LIDIANE LEAL ROCHA**, intitulada “Estudo de comunidades bacterianas de solos do Manguezal da Barra Grande, Icapuí – CE e Seleção de cepas com potencial para degradar hidrocarbonetos”, a Banca Examinadora considerando o conteúdo do trabalho e a apresentação realizada, considera a **DISSERTAÇÃO APROVADA**.

Profa Dra. Vânia Maria Maciel Melo 
(orientadora)

Profa. Dra. Cristina de Almeida Rocha Barreira 
(membro interno)

Profa. Dra. Lucymara Fassarela Agnez Lima 
(membro externo)

Fortaleza, 24 de junho de 2008

**Aos meus pais, *Irinea e Wellington,*
dedico com amor.**

AGRADECIMENTOS

A Deus por todos os momentos.

Aos meus queridos pais, Irinea Pereira Leal Rocha e José Wellington Silveira Rocha, pelo amor, dedicação, incentivo, educação, confiança e otimismo durante toda a minha vida. Especialmente minha mãe que acompanhou de perto todos os momentos e sempre me deu força para continuar superando todos os obstáculos. Obrigada por tudo. E ao meu irmão, Marcos Aurélio Leal Rocha, e minha sobrinha, Beatriz Ferreira Leal Rocha, por toda a alegria e carinho. Beatriz, eu nunca esquecerei os abraços e beijinhos que me deu nas horas certas.

Ao meu noivo, José Wilker de Lima Silva, que me ajudou na realização desse trabalho, principalmente nos momentos mais delicados. Obrigada pelo amor, carinho, apoio, atenção, força e pelos vários momentos de alegria. E aos seus pais por me receberem em sua casa, mesmo que para ficar apenas estudando.

À minha orientadora, Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo, pela oportunidade, amizade, ensinamentos, orientação e sugestões para elaboração e execução deste trabalho. Obrigada por contribuir de forma tão ativa na minha formação acadêmica durante esses mais de cinco anos de convivência.

À Profa. Dra. Cristina Rocha-Barreira, pelo conhecimento transmitido, ajuda nas análises estatísticas e principalmente por ter aceitado fazer parte da comissão avaliadora desse trabalho.

À Profa. Dra. Lucymara Fassarella Agnez Lima, por ter aceitado o convite para participar da banca avaliadora desse trabalho.

Às Profas. Ms. Suzana Cláudia Silveira Martins e Dra. Cláudia Miranda Martins, pela amizade e simpatia com que sempre me receberam. Obrigada por me ajudarem em um dos momentos que mais precisei.

À Profa. Dra. Ana de Fátima Urano de Carvalho, por disponibilizar seu laboratório no decorrer dos experimentos.

Ao prof. Ms. Paulo Roberto Ferreira Gomes da Silva, do Laboratório de Geologia Marinha da Divisão de Oceanografia Abiótica do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará (UFC), por permitir a realização das análises granulométricas em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, do Laboratório de Citogenética e Genética Molecular, por permitir a realização da identificação molecular das cepas bacterianas desse trabalho em seu laboratório.

À Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa, da Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará, NUTEC, pela realização das Cromatografias Gasosas.

Aos amigos do laboratório, presentes ou não, Alysson Lira, Caio Araújo, Denise Hissa, Genilton Faheina, Geórgia Colares, Glauber Melo, Júlio Ximenes, Luína Benevides, Natasha Wanderley, Niédila Nascimento, Ruann Janser, Simone Lopes, Tiago Albuquerque, Tallita Tavares, Tatiana Nunes, Thatyane Vidal e Yuri Sampaio pela companhia diária e amizade. Em especial, Vanessa Rodrigues, Raphaela Gomes e Fernanda Paes, minhas grandes amigas, que sempre me deram apoio e me proporcionaram vários dias mais alegres durante esses anos.

Aos “best friends”, Geórgia Barguil Colares e Alysson Lira Angelim, por terem acompanhado bem de perto esse trabalho e pela grande ajuda na sua realização. A contribuição de vocês foi essencial. Obrigada pelas conversas, apoio e brincadeiras. Meus dias de trabalho ficaram mais felizes com a presença de vocês.

À Rivaldina Carmo, uma mãe durante todos esses anos de trabalho no laboratório, por seu carinho, atenção e apoio.

Ao funcionário Valdenor de Oliveira, por sua presença alegre e cuidado constante com o laboratório.

A todos os amigos que algumas vezes saíram de suas rotinas e colaboraram de alguma forma para execução desse trabalho como Denise Hissa, Natasha Wanderley e Genilton Faheina.

Aos amigos de mestrado, por todos os momentos que marcaram essa passagem. Em especial à Marcelo Soares pela ajuda nas análises estatísticas, à Ismália Maia, por várias horas de conversa, apoio e ajuda nas etapas finais desse trabalho e à Fernanda Paes pela convivência agradável durante o primeiro ano do mestrado e pela grande contribuição na realização desse trabalho. Obrigada por tudo.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que direta, ou indiretamente, ajudaram na realização desse trabalho.

**"Grandes realizações não
são feitas por impulso, mas
por uma soma de pequenas
realizações."**

Vincent Van Gogh

RESUMO

Os manguezais são ecossistemas entremarés produtivos e biologicamente importantes que ocorrem em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Áreas de manguezais não perturbados fornecem habitats para uma variedade de plantas, animais e microrganismos. Estes ecossistemas recebem materiais sedimentares do mar e continente, tornando-se uma área de transição com elevada produtividade. Importantes processos, tais como ciclagem de nutrientes, estão diretamente conectados à atividade e diversidade das comunidades microbianas dos solos do manguezal. No entanto, devido a sua localização estratégica, manguezais têm sido amplamente impactados por todo o mundo. A compreensão da estrutura e das funções das comunidades microbianas e suas adaptações às alterações ambientais resultantes de xenobióticos, alterações climáticas e a prática industrial, tais como a exploração petrolífera, é essencial para manter ou restabelecer funções desejáveis do ecossistema. Dessa forma, o presente estudo investigou a estrutura de comunidades bacterianas de amostras de solos do manguezal da Barra Grande, Icapuí (37° 20'W, 4° 40'S), por método independente de cultivo usando Polimorfismo do Tamanho de Fragmentos de Restrição Terminal (T-RFLP) e também avaliou o método dependente de cultivo (enriquecimento) para isolar cepas de bactérias com potencial para degradar petróleo e n-Hexadecano. Um total de três pontos foi amostrado ao longo do manguezal, com 150 metros de distância entre cada um deles. Temperatura, pH, salinidade, matéria orgânica e granulometria dos solos foram medidas. Análises de T-RFLP foram feitas após a digestão de DNA genômico com as enzimas *HhaI* e *MspI* e o número e diversidade de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) de cada amostra foi analisado pelo programa T-Align (Applied Biosystems). A cepa selecionada para testes de diferentes concentrações de n-Hexadecano foi identificada pelo seqüenciamento do gene do rRNA 16S. Esta cepa foi também avaliada em relação à susceptibilidade a radiação UV e antibióticos. Os resultados mostraram que as comunidades bacterianas de solos do manguezal são semelhantes em número de OTUs, mas diferem em composição. Provavelmente a peculiaridade das variáveis físico-químicas e granulometria do solo são responsáveis pelas diferenças na composição e estrutura das comunidades bacterianas. Dezoito cepas de bactérias foram isoladas de culturas de enriquecimento com petróleo e quatro cepas mostraram potencial particular para degradar n-Hexadecano. Uma cepa identificada como *Acinetobacter* sp. IC18 foi caracterizada como uma boa degradadora de hidrocarboneto, pois foi capaz de degradar 1% do n-Hexadecano em 48 horas. Esta cepa também utilizou cerca de 30% de uma concentração total de 20% (v/v) de n-Hexadecano durante o mesmo período de incubação. Além disso, IC18 foi susceptível a vários antibióticos e resistente à radiação UV. Em conclusão, a estrutura da comunidade bacteriana de solos do manguezal da Barra Grande parece não ser afetada pela presença da exploração petrolífera em Icapuí. Além disso, os solos deste manguezal são colonizados por várias cepas com potencial para degradar hidrocarbonetos, que é particularmente interessante em virtude do risco de derramamentos de petróleo.

Palavra-chaves: manguezal, petróleo, n-Hexadecano, T-RFLP.

ABSTRACT

Mangroves are biologically important and productive intertidal ecosystems along subtropical and tropical coastlines. Undisturbed mangroves provide habitats for a variety of plants, microorganisms and animals. These ecosystems receive sedimentary materials from both sea and continent, becoming a transitory area with high productivity. Important processes such as nutrient cycling are directly connected to the activity and diversity of the microbial communities of mangrove soils. Even though, because of their strategically location, mangroves have been widely impacted around the world. Understanding the structure and functions of microbial communities and their adaptations to environmental alterations resulting from xenobiotics, climate change and industrial practice, such as petroleum exploitation, is essential to maintaining or restoring desirable ecosystem functions. The present study investigated the structure of bacterial communities in soil samples of Barra Grande mangrove, Icapui (37° 20'W, 4° 40'S), by culture-independent method using Terminal Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) and also evaluated the culture-dependent method (enrichment) to isolate bacterium strains with potential to degrade petroleum and n-Hexadecane. A total of three sites were sampled inside mangrove, with 150 m far from each other. Temperature, pH, salinity, organic matter and granulometry of the soils were measured. T-RFLP analyses were done after digestion of genomic DNA with *HhaI* and *MspI* enzymes and the number and diversity of Operational Taxonomic Unity (OTU) of each site was analyzed by T-Align program (Applied Biosystems). The strain selected to test different n-hexadecane concentrations was identified by sequencing of rRNA 16 S. This strain was also evaluated in relationship antibiotic and UV radiation susceptibility. The results showed that the bacterial communities of the mangrove soils are similar in number of OTUs but they are different in composition. Probably the peculiarity of physical-chemical variables and soil granulometry are responsible by the differences in bacterial community composition and structure. Eighteen bacterium strains were isolated from petroleum enrichment culture and four strains showed particular potential to degrade n-Hexadecane. One strain identified as *Acinetobacter* sp. IC18 was characterized as a good hydrocarbon degrader since it was able to degrade 1% of n-Hexadecane in 48h. This strain also utilized about 30% of a total concentration of 20% (v / v) n-Hexadecane during the same period of incubation. Moreover, IC18 was susceptible to several antibiotics and resistant to UV radiation. In conclusion, the structure of the bacterial community of Barra Grande mangrove seems not affected by the presence of the petroleum exploration in Icapui County. In addition, the soils of this mangrove are colonized with several strains with potential to degrade hydrocarbons which is particularly interesting considering the risk of petroleum spills.

Key words: mangrove, petroleum, n-Hexadecane, T-RFLP

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Princípio da técnica de T-RFLP.....	23
Figura 2.	Rotas metabólicas básicas para degradação de n-alcenos. Apresentando as três principais rotas documentadas para microrganismos: oxidação terminal, oxidação terminal seguida por ω -Oxidação e oxidação subterminal	32
Figura 3.	Localização do manguezal da Barra Grande, Icapuí (Ceará), mostrando em detalhe os pontos de coleta	37
Figura 4.	Vista geral da planície de maré e manguezal da Barra Grande durante a maré baixa	38
Figura 5.	Procedimento de coleta de solo com amostrador cilíndrico	39
Figura 6.	Agrupamento com base na matriz de distância euclidiana para fatores abióticos dos pontos de amostragem P1, P2 e P3 do manguezal da Barra Grande, Icapuí-CE	50
Figura 7.	Número total de ribotipos de bactérias de amostras de solos dos pontos P1, P2 e P3 do manguezal da Barra Grande, Icapuí-CE, com os percentuais de ribotipos exclusivos de cada ponto, obtidos a partir da digestão com a enzima de restrição <i>MspI</i>	50
Figura 8.	Tamanho dos fragmentos de restrição terminal e suas respectivas abundâncias relativas de amostras de solos do ponto 1 (A), 2 (B) e 3 (C), obtidas da digestão com a enzima de restrição <i>MspI</i>	51
Figura 9.	Número total de ribotipos de bactérias de amostras de solos dos pontos P1, P2 e P3 do manguezal da Barra Grande, Icapuí-CE, com os percentuais de ribotipos exclusivos de cada ponto, obtidos a partir da digestão com a enzima de restrição <i>HhaI</i>	52
Figura 10.	Tamanho dos fragmentos de restrição terminal e suas respectivas abundâncias relativas de amostras de solos do ponto 1 (A), 2 (B) e 3 (C), obtidas da digestão com a enzima de restrição <i>HhaI</i>	53
Figura 11.	Agrupamento com base na matriz de similaridade de Bray-Curtis para o número e abundância de ribotipos das comunidades de bactérias dos solos obtidos da digestão com a enzima <i>MspI</i> dos pontos P1, P2 e P3 do manguezal da Barra Grande, Icapuí-CE	54

Figura 12.	Agrupamento com base na matriz de similaridade de Bray-Curtis para o número e abundância de ribotipos das comunidades de bactérias dos solos obtidos da digestão com a enzima <i>HhaI</i> dos pontos P1, P2 e P3 do manguezal da Barra Grande, Icapuí-CE	54
Figura 13.	Frascos contendo meio mineral com petróleo e sedimentos dos pontos 1, 2 e 3, respectivamente, após quatro dias de incubação (1° enriquecimento)....	55
Figura 14.	Crescimento de linhagens bacterianas isoladas do manguezal da Barra Grande, Icapuí-CE, em meio mineral contendo 1% (v/v) de n-Hexadecano como única fonte de carbono	56
Figura 15.	Aspecto das colônias e células de linhagens de bactérias isoladas de solos do manguezal da Barra Grande, Icapuí-CE. Isolado IC6 (A), IC17 (B), IC18 (C) e IC20 (D) cultivados em PCA com 2 % NaCl por 48 horas a 32°C. As lâminas foram coradas por coloração de Gram e fotografadas em microscópio óptico com aumento de 1000 x	57
Figura 16.	Curvas de crescimento dos isolados IC6, IC17, IC18 e IC20 na presença de 10% de n-Hexadecano	58
Figura 17.	Curvas de crescimento de IC18 em diferentes concentrações de n-Hexadecano, 1, 10, 15 e 20%	59
Figura 18.	Percentual de hidrofobicidade da cepa <i>Acinetobacter</i> sp. IC18	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Propriedades físico-químicas do n-Hexadecano.....	31
Tabela 2.	Formulação usada nas PCRs	41
Tabela 3.	Composição da reação para digestão com <i>MspI</i> ou <i>HhaI</i>	41
Tabela 4.	Composição do meio mineral Bushnell e Haas (1941)	43
Tabela 5.	Composição da solução de micronutrientes	43
Tabela 6.	Formulação usada nas PCRs	48
Tabela 7.	Variáveis ambientais dos pontos de coleta e características gerais dos solos	49
Tabela 8.	Índices de diversidade para as comunidades de bactérias de amostras de solos do manguezal da Barra Grande, Icapuí, CE	55
Tabela 9.	Susceptibilidade da cepa <i>Acinetobacter</i> sp. IC18 a diferentes antibióticos ..	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-FAN	6-carboxifluoresceína
ANOVA	Análise de Variância
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CG	Cromatografia Gasosa
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
DIC	Detector de Ionização por Chama
DO	Densidade Óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
GPS	Sistema de Posicionamento Global
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
IBEST	Initiative for Bioinformatics and Evolutionary Studies
Log K_{ow}	Coefficiente de Partição octanol-água
\log_2	Logaritmo na base 2
MiCA	Microbial Community Analysis
mM	Milimolar
Nm	Nanômetros
NUTEC	Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará
OTU	Unidade Taxonômica Operacional
pb	Pares de bases
PCA	Agar para Contagem em Placas
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVC	Policloreto de Vinila
rDNA	Ácido Desoxirribonucléico Ribossomal
RNase	Enzima que cliva ácido ribonucléico
ROX	6-carboxi-X-rodamina
rpm	Rotações por minuto
SBM	Sociedade Brasileira de Microbiologia
SEMACE	Superintendência Estadual de Meio Ambiente
TRFLP	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição Terminal
T-RFs	Fragmentos de Restrição Terminal
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
ufc	Unidades Formadoras de Colônias
UFC	Universidade Federal do Ceará
UPGMA	Associação Média Não Ponderada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. Manguezais – Aspectos gerais	19
2.2. Diversidade microbiana de solos – Técnicas de avaliação	20
2.3. Petróleo e seus constituintes – Destino e efeitos no ambiente	23
2.4. Biodegradação do petróleo e seus hidrocarbonetos constituintes	25
2.4.1. Microrganismos degradadores	25
2.4.2. Principais fatores que influenciam a biodegradação	27
2.4.3. Aspectos genéticos da biodegradação	29
2.4.4. Biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos – Os n-alcenos	30
2.4.5. Rotas de biodegradação aeróbia de n-alcenos	31
2.5. Biorremediação - Técnicas utilizadas em manguezais	32
2.6. A exploração de petróleo em Icapuí	34
3. OBJETIVO GERAL	36
3.1. Objetivos específicos	36
4. METODOLOGIA	37
4.1. Área de estudo	37
4.2. Coleta das amostras de solo	38
4.3. Análise granulométrica e teor de matéria orgânica	39
4.4. Determinação do tamanho e diversidade de comunidades de bactérias de solos de manguezal	40
4.5. Isolamento e seleção de bactérias por método de enriquecimento	42
4.6. Seleção de bactérias degradadoras de n-Hexadecano	43
4.7. Avaliação da biodegradação de diferentes concentrações de n-Hexadecano por linhagens bacterianas selecionadas	44
4.8. Avaliação da biodegradação de n-Hexadecano por cromatografia gasosa	44
4.9. Avaliação da hidrofobicidade celular	45
4.10. Atividade de emulsificação	45
4.11. Avaliação da susceptibilidade a antibióticos e a radiação ultravioleta	46
4.12. Identificação molecular da linhagem de bactéria selecionada	46
4.13. Análises estatísticas	48

5. RESULTADOS	49
5.1. Caracterização das amostras de solo	49
5.2. Tamanho e diversidade das comunidades bacterianas de solos do manguezal ...	49
5.3. Isolamento e seleção de bactérias de solo degradadoras de petróleo e derivados	55
5.4. Biodegradação de n-Hexadecano por bactérias selecionadas	58
5.5. Identificação molecular da bactéria selecionada	59
5.6. Hidrofobicidade celular da cepa <i>Acinetobacter</i> sp. IC18	60
5.7. Avaliação da susceptibilidade de <i>Acinetobacter</i> sp. IC18 a antibióticos e a radiação ultravioleta	60
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
APÊNDICE	85

1. INTRODUÇÃO

Os manguezais são ecossistemas costeiros que ocorrem em regiões tropicais e subtropicais do mundo ocupando as áreas entremarés. Esses ecossistemas são particularmente susceptíveis a poluição por óleo, pois eles estão usualmente em regiões ativas na produção e transporte de óleo e outras atividades antropogênicas, atuando como reservatório eficiente de poluentes derivados do mar, rios e águas subterrâneas (BURNS; GARRITY; LEVINGS, 1993). As características intrínsecas desses ambientes, incluindo o relativamente alto teor de sulfeto e matéria orgânica nos solos, as condições anóxicas em 1-3 cm abaixo da camada de solo superficial, a baixa natureza energética do ambiente, e o fluxo de corrente reduzido, podem favorecer a deposição e acumulação de contaminantes (KE *et al.*, 2005).

Durante as últimas décadas, o uso extensivo de petróleo tem aumentado o risco de liberação de hidrocarbonetos tóxicos no ambiente, especialmente em regiões de manguezais, que são conhecidas por sua alta vulnerabilidade à poluição. Entre os mecanismos utilizados para controlar o destino de hidrocarbonetos após a contaminação, destaca-se a biorremediação, que é um processo de despoluição que utiliza o potencial de microrganismos para degradar determinadas substâncias no meio ambiente, oferecendo novas possibilidades para descontaminação de solos e aquíferos contendo compostos tóxicos. Além disso, apresenta baixo custo associado à possibilidade de uma completa mineralização do poluente, eliminando os riscos de futuras contaminações e aumentando o nível de aceitação por parte da opinião pública (WHITE; GREER; INNIS, 1996).

O uso de microbiota indígena ou nativa para biorremediação é de grande interesse, pois é frequentemente mais útil e benéfica do que inóculos comerciais que podem ser menos competentes que microrganismos indígenas (GROSSER; WARSHAWSKY; VESTAL, 1995). Além disso, devido às restrições existentes à introdução de microrganismos exógenos no ambiente, é necessário estabelecer o potencial de biodegradação inerente às espécies autóctones de um determinado local, além de compreender a biotransformação de compostos xenobióticos e a biodiversidade das comunidades microbianas responsáveis por estes processos no meio ambiente ao qual já estão adaptadas (MACCORMACK; FRAILE, 1997).

Nesse contexto, a Área de Proteção Ambiental do Manguezal da Barra Grande situada em Icapuí (Ceará) é considerada de relevância ecológica e de grande produtividade pesqueira. No entanto, este ecossistema de alta sensibilidade ambiental localiza-se em uma região conhecida pelo seu alto potencial petrolífero, sendo assim considerada como área de risco a contaminação por hidrocarbonetos do petróleo. Dessa forma, esse estudo contribui

para o conhecimento da diversidade bacteriana autóctone de solos do Manguezal da Barra Grande, Icapuí-CE e avaliar o potencial desses microrganismos para degradar hidrocarbonetos derivados do petróleo, visando sua utilização em atividades de biorremediação *in situ*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Manguezal – Aspectos gerais

Os manguezais são importantes ecossistemas costeiros de transição entre os ambientes terrestre e marinho, característico de regiões tropicais e subtropicais, estando sujeito ao regime das marés. Esses ambientes ocorrem em regiões costeiras abrigadas e apresentam uma ampla diversidade de nichos, que servem como habitat adequado para alimentação, proteção, reprodução, criação e desova de muitas espécies de animais residentes e migratórios. Em particular, os manguezais são importantes berçários para peixes e crustáceos de valor comercial (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995).

Segundo Sant'Anna e Whately (1981), apesar das amplas flutuações de fatores ambientais (oxigênio dissolvido, salinidade, matéria orgânica e inorgânica), os manguezais apresentam grande produtividade biológica e alto teor de matéria orgânica, sendo considerados muito importantes do ponto de vista ecológico por sua contribuição na cadeia alimentar costeira. Além disso, as espécies que habitam esse ambiente são aptas para competir e sobreviver em condições ambientais tão adversas e variáveis.

As árvores de mangue provêm lenha, carvão, madeira e matérias-primas para papel e papelão e outros materiais social e economicamente importantes, como forragem para gado, medicamentos e tinturas. Além disso, áreas de manguezais têm inúmeras utilizações para recreação, turismo, educação ambiental, criação de peixes e outras espécies marinhas. Devido a sua localização estratégica e vegetação densa, os manguezais protegem o litoral de danos causados pelo impacto das ondas, aumentando a estabilidade da região litorânea. Adicionalmente, são também importantes por sua função como filtros biológicos e depósito para vários poluentes. Portanto, os manguezais têm importância primordial para a vida de muitas espécies, inclusive o homem (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995).

Áreas de manguezal ocorrem entre os Trópicos de Câncer e Capricórnio (23°27' N e 23°27' S), podendo estender-se até aproximadamente as latitudes de 32°N e 39°S. As regiões com maior desenvolvimento estrutural de manguezais encontram-se nas proximidades da linha do Equador, onde predominam altas temperaturas, taxas de precipitação e amplitude de marés. No território brasileiro, existem registros de zonas de manguezal desde o Amapá até Santa Catarina, sendo Laguna, localizada na latitude 28° 30' S, a última ocorrência deste ecossistema (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995; LACERDA; ITTEKKOT; PATCHINEELAM, 1995; SCHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 2000).

Atualmente, existem cerca de 152.000 Km² de áreas de manguezais no mundo, sendo as maiores áreas encontradas na Ásia e África, seguida pela América do Norte e Central. Cerca de 20 por cento dessa área mundial de manguezais foram perdidos desde 1980. Cinco países (Indonésia, Austrália, Brasil, Nigéria e México) em conjunto são responsáveis por 48 por cento do total mundial. O Brasil possui entre 10.000 - 25.000 Km² de áreas cobertas por manguezal (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO, 2007).

Os manguezais são áreas especialmente protegidas. As Constituições Federal e Estadual, e os vários Decretos e Leis existentes, inclusive no nível municipal, têm demonstrando uma grande preocupação com o meio ambiente. O Código Florestal, Art. 2, Lei n.º. 4771, de 15 de setembro de 1965, declara os manguezais como Áreas de Preservação Permanente e o Art. 18 da Lei n.º. 6938, de 31 de agosto de 1981, Decreto n.º. 89336, de 31 de abril de 1984 e Resolução n.º. 4 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), de 18 de setembro de 1985, os consideram como Reservas Ecológicas, o que representa um grande obstáculo contra a degradação desse ecossistema, uma vez que restringem seu uso a práticas não agressivas ao meio ambiente (MARTIN; LANA, 1993; SCHAEFFER-NOVELLI, 1995). A Constituição do Estado do Ceará (1989), art. 265 V, também faz referência à preservação dos manguezais, pois proíbe a indústria, comércio, hospitais e residências despejarem nesses ambientes resíduos químicos e orgânicos não tratados.

Entretanto, os manguezais, que são importantes ilhas úmidas entremarés encontradas ao longo da linha de costa de regiões tropicais e subtropicais, estão próximos às atividades humanas e vêm sofrendo impactos que alteram a sua qualidade ambiental, como por exemplo, a contaminação por derivados do petróleo. Dessa forma, torna-se indispensável o estudo de tais ecossistemas, tendo em vista sua recuperação ou manutenção em condições naturais.

2.2. Diversidade microbiana de solos – Técnicas de avaliação

O solo representa um ecossistema complexo em que os microrganismos presentes adaptam-se a microhabitats e vivem juntos em consórcios, interagindo entre si e o ambiente. A diversidade microbiana é crucial para o funcionamento do solo, pois os microrganismos são responsáveis por uma variedade de processos geoquímicos, ciclagem de nutrientes e decomposição (DUBEY; TRIPATHI; UPADHYAY, 2006).

De acordo com uma estimativa atual, 1 g de solo pode abrigar possivelmente até 10 bilhões de bactérias de 4000–7000 espécies diferentes e uma densidade de biomassa de 300–30.000 kg/hectare (DUBEY; TRIPATHI; UPADHYAY, 2006). No máximo, são conhecidos somente alguns milhares destes microrganismos e aproximadamente apenas 5000 organismos não-eucarióticos foram descritos formalmente em contraste com milhões de espécies de insetos descritas (PACE, 1997).

As populações microbianas presentes nos solos não apenas têm a capacidade para transformar ou degradar compostos naturais, mas também compostos xenobióticos recalcitrantes. Assim, os solos podem ser fontes de microrganismos e genes para degradação e transformação de vários compostos orgânicos, que tem relevância para biorremediação (DUBEY; TRIPATHI; UPADHYAY, 2006).

Os microrganismos de solos desempenham funções cruciais no ecossistema manguezal pela participação em vários passos de decomposição e mineralização de serrapilheira, desempenhando uma contribuição essencial na produtividade desse ecossistema. Em manguezais tropicais, bactérias e fungos constituem 91% da biomassa microbiana total, enquanto algas e protozoários representam somente 7 e 2%, respectivamente. Dessa forma, o conhecimento da diversidade microbiana e atividades de microrganismos em solos de manguezal são importantes para entender como o ecossistema manguezal funciona, o que é necessário para formular estratégias de conservação e manejo adequadas (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001; LIANG *et al.*, 2007).

Técnicas de cultivo tradicionais têm rendido informações valiosas sobre interações microbianas com hidrocarbonetos no ambiente, no entanto, sabe-se que apenas uma pequena porção da diversidade microbiana total pode ser obtida a partir desses estudos convencionais. Por exemplo, bactérias com habilidades catabólicas desejáveis têm freqüentemente sido isoladas após enriquecimentos. Entretanto, essa metodologia empregada é seletiva para espécies bacterianas que crescem rápido e são adaptadas para o crescimento nos meios de cultura utilizados. Dessa forma, estudos de biodegradação com isolamento de microrganismos a partir de enriquecimento são importantes para entender mecanismos gerais e selecionar degradadores, mas não para revelar a importância ambiental dessa microbiota. Na realidade, tem sido observado que em muitas amostras ambientais, as bactérias que são mais dominantes não são cultiváveis (IWAMOTO; NASU, 2001; TORSVIK; OVREAS, 2002; VAN HAMME; SINGH; WARD, 2003; DUBEY; TRIPATHI; UPADHYAY, 2006).

Para um maior entendimento da estrutura e dinâmica de comunidades microbianas naturais, técnicas de cultivo tradicionais devem ser complementadas com métodos

independentes de cultivo, como os baseados em análises de genes ribossomais do rRNA 16S, que são genes bastante conservados e encontrados em células procarióticas. Esses estudos podem levar a descoberta de padrões comuns que estão associados com a biodegradação, o que ajudará a desenvolver novas ferramentas para avaliar rapidamente processos de biorremediação (HEAD; JONES; RÖLING, 2006).

Uma das técnicas que vem sendo extensivamente utilizada para estudar mudanças na estrutura e diversidade da comunidade microbiana de solos é o T-RFLP (Polimorfismo no Tamanho de Fragmentos de Restrição Terminal), que combina amplificação de produtos de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de genes do rRNA de amostras de DNA total de solos com técnica de genotipagem molecular (ou *fingerprinting*), que permite a obtenção de um perfil genético da comunidade microbiana.

Neste método, um iniciador marcado por fluorescência é usado para amplificar uma região selecionada de genes bacterianos que codificam rRNA 16S de uma comunidade bacteriana. Os produtos de PCR são digeridos com enzimas de restrição e o fragmento de restrição terminal marcado por fluorescência (T-RFs) é precisamente medido por um seqüenciador de DNA automatizado (Fig. 1). Assim, em princípio, cada fragmento representa uma única Unidade Taxonômica Operacional (OTU) na amostra, que idealmente corresponde a microrganismos relacionados filogeneticamente. A distribuição quantitativa relativa dentro de um perfil pode ser determinada, pois a intensidade de fluorescência de cada pico é proporcional à quantidade de DNA genômico presente para cada OTU na amostra (LIU *et al.*, 1997; IWAMOTO; NASU, 2001; EGERT; FRIEDRICH, 2003; SINGH *et al.*, 2006).

A partir de estudos moleculares independentes de cultivo, observou-se que comunidades microbianas dentro de ecossistemas contaminados tendem a ser dominadas por microrganismos capazes de utilizar substâncias tóxicas e sobreviver à contaminação. Como resultado, estas comunidades são tipicamente menos diversas em comparação com sistemas não estressados, embora essa diversidade possa ser influenciada pela complexidade de misturas químicas presente e o tempo em que as populações estiveram expostas (MACNAUGHTON *et al.*, 1999). Dessa forma, o uso de técnicas independentes de cultivo tem auxiliado na descoberta de grande parte da diversidade microbiana do solo, rendendo o seqüenciamento de muitas novas linhagens filogenéticas, além da observação dos efeitos na comunidade microbiana de estresse ambiental e perturbações como poluição (TORSVIK; SÖRHEIM; GOKSÖYR, 1996; TORSVIK; OVREAS, 2002).

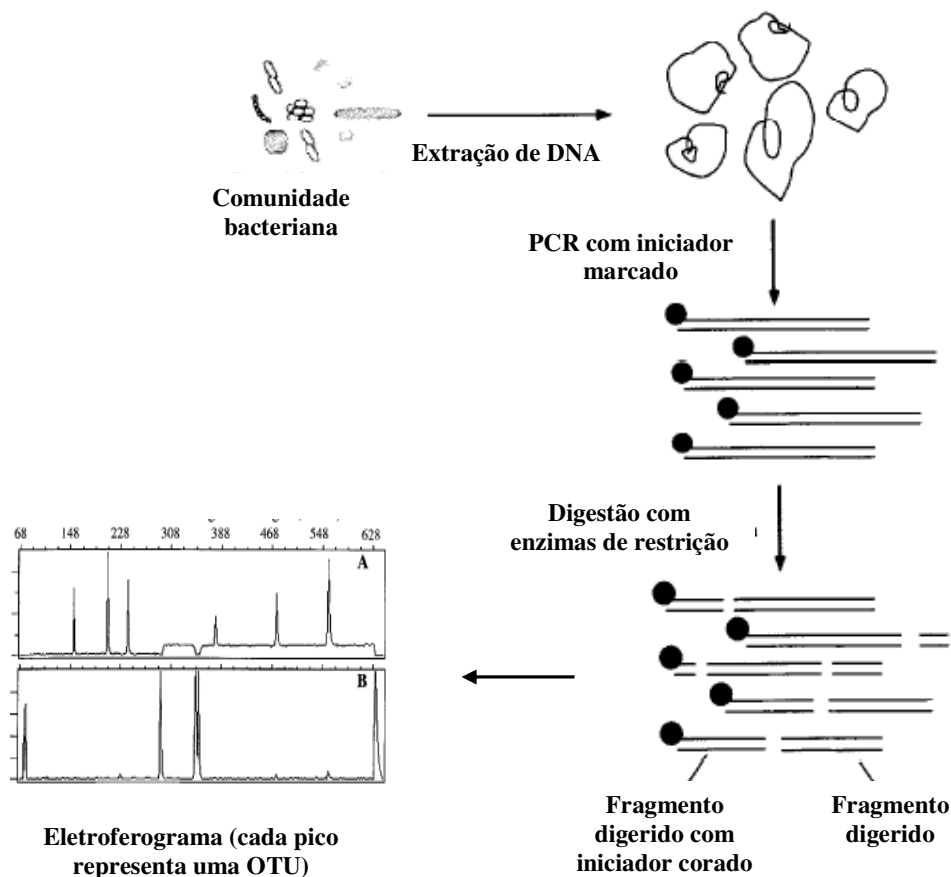


Figura 1. Princípio da técnica de T-RFLP (adaptado de IWAMOTO; NASU, 2001).

2.3. Petróleo e seus constituintes – Destino e efeitos no ambiente

Atualmente, um dos principais problemas ambientais é a contaminação por hidrocarbonetos resultante de atividades relacionadas à indústria petroquímica, tais como extração, transformação, transporte, distribuição, vazamentos e derramamentos (VOLKE-SEPÚLVEDA; GUTIÉRREZ-ROJAS; FAVELA-TORRES, 2006).

O petróleo é uma mistura complexa de compostos orgânicos e com alto conteúdo de energia. O óleo cru representa a fração líquida do petróleo, consistindo de hidrocarbonetos com relação carbono e hidrogênio 2:1, além de conter 3% (v/v) de elementos como nitrogênio, enxofre e oxigênio, e elementos traços, compreendendo menos que 1% (v/v), incluindo fósforos e metais pesados como vanádio e níquel (OKOH, 2006). Dentro dessa complexidade, os componentes do óleo cru podem ser classificados em quatro grupos principais: os hidrocarbonetos saturados (compreendendo os alifáticos n-alcenos e alcenos

ramificados e os cicloalcanos) e aromáticos, e os componentes polares, resinas e asfaltenos (ROSATO, 1997; HEAD; JONES; RÖLING, 2006).

O destino do óleo no ambiente marinho é determinado por uma variedade de processos químicos, físicos e biológicos. A combinação desses processos é denominada de intemperismo e é capaz de reduzir a concentração dos hidrocarbonetos em sedimentos (KE *et al.*, 2002). A baixa densidade do óleo cru ($0,85 \text{ g/cm}^3$) combinada com a ação dos ventos e ondas, marés e correntes pode espalhar o óleo facilmente da sua fonte original. A evaporação é um processo abiótico importante no intemperismo do óleo, pois os componentes do óleo cru com um ponto de ebulição abaixo de 200° C são mais facilmente volatilizados, conduzindo a uma redução de cerca de 35% dos componentes iniciais. A foto-oxidação é outro processo importante que muda a composição de óleo cru com o passar do tempo e afeta o destino do óleo derramado em ambientes marinhos (DUTTA; HARAYAMA, 2000). A biodegradação do óleo acontece mais lentamente do que o desgaste físico, no entanto, desempenha um papel muito importante a longo prazo no intemperismo do óleo derramado, não devendo ser negligenciada (KE *et al.*, 2002).

A natureza dos solos (granulometria, conteúdo de matéria orgânica e composição mineralógica), bem como a dinâmica das ondas, influenciam a acumulação de hidrocarbonetos em sedimentos marinhos. Regiões com solos argilosos e ricos em matéria orgânica, protegido da ação das ondas, são zonas de preferencial acumulação, quando comparadas com aqueles locais de substrato grosseiro e sob ação direta das ondas (LE DRÉAU *et al.*, 1997). Dessa forma, quando acontecem acidentes envolvendo derrames de óleo em ambiente marinho, regiões de manguezal podem ser atingidas durante marés altas, funcionando como barreiras naturais à penetração de óleo em direção ao continente (KE *et al.*, 2002).

A poluição por petróleo em ecossistemas de manguezal tem várias conseqüências significantes. Quando derramamentos de óleo entram no manguezal, esse óleo embebe os solos e/ou recobre troncos expostos, raízes escora e pneumatóforos causando muitas vezes extensa mortalidade dos mangues com declínio da produtividade ou irregularidades de crescimento (PROFFITT; DEVLIN; LINDSEY, 1995). Um dos efeitos mais imediatos e óbvios é a queda das folhas da vegetação de mangue. No entanto, um dos fatores que contribuem para uma remoção efetiva de quantidades significativas de óleo em manguezais é o fluxo de maré, pois a cobertura de óleo na superfície das folhas é facilmente lavada ou diluída pela ida e volta freqüente das marés (KE *et al.*, 2002). Além disso, os solos podem apresentar poluição por hidrocarbonetos após um evento de derramamento, mesmo quando

não haja evidência de contaminação por petróleo nas árvores ou em amostras de água. Esse óleo retido no solo pode inibir o estabelecimento e diminuir a sobrevivência de mudas de mangue por vários anos, além de poder causar mutações (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001). Contaminações crônicas ou derramamentos de óleo que resultam em elevadas concentrações de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em solos, por exemplo, podem produzir mutações que causam deficiência de clorofila em *Rhizophora mangle* (PROFFITT; DEVLIN; LINDSEY, 1995). Além de matar diretamente a fauna do manguezal, o óleo pode ter efeitos indiretos resultantes da modificação de habitat (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001).

A habilidade dos solos de manguezal para reter petróleo depende principalmente das condições hidrodinâmicas locais, topografia e natureza do substrato (MUNOZ *et al.*, 1997). Solos de manguezal são predominantemente anaeróbios incluindo lamas sulfídicas, onde geralmente menos que 1,0 cm da superfície do sedimento é aeróbio. Além disso, vários aspectos hidrodinâmicos desses corpos d'água resultam em longos tempos de residência de materiais depositados, assim os resíduos do óleo acumulam-se e persistem em profundidades da lama por períodos de até 20 anos (BURNS; CODI; DUKE, 2000). No entanto, a extensão do dano ao manguezal devido à contaminação por óleo dependerá do tipo, quantidade e estado de intemperismo do óleo, as espécies de mangue e as condições de maré e climáticas prevaletentes no local. A escala e o tipo de derramamento de óleo afetam a taxa de dissipação e degradação dos resíduos de óleo nos solos (BURNS; CODI, 1998; KATHIRESAN; BINGHAM, 2001).

2.4. Biodegradação do petróleo e seus hidrocarbonetos constituintes

2.4.1. Microrganismos degradadores

Centenas de milhões de litros de petróleo entram no ambiente todos os anos através de fontes naturais e antropogênicas. A contribuição de vazamentos naturais de óleo no ambiente marinho, sozinha seria bastante para cobrir os oceanos do mundo com uma espessa camada de óleo. No entanto, isso não ocorre devido à eficiência e versatilidade de microrganismos que degradam hidrocarbonetos. Geralmente, acredita-se que estes microrganismos estão presentes em números muito pequenos, todavia, ao prover condições que lhes permitam levar vantagem na utilização de hidrocarbonetos como uma fonte de

carbono e energia, eles crescem e se multiplicam rapidamente (HEAD; JONES; RÖLING, 2006).

A biodegradação de óleo é um dos mais importantes processos envolvidos no intemperismo e a remoção eventual de petróleo do ambiente (VENOSA; ZHU, 2003). É bem conhecido que bactérias que degradam petróleo ocorrem extensivamente em uma ampla variedade de ambientes marinhos e aquáticos, inclusive solo e coluna d'água (RAMSAY *et al.*, 2000).

Grupos bacterianos típicos já conhecidos por sua capacidade para degradar hidrocarbonetos incluem *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Microbulbifer*, *Sphingomonas*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Paracoccus*, *Bacillus* e *Rhodococcus*. Fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, *Penicilium*, *Fusarium*, *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Paecilomyces*, *Talaromyces*, *Graphium* e leveduras como *Candida*, *Yarrowia* e *Pichia* têm sido citados na degradação de hidrocarbonetos (OKOH, 2006; WENTZEL *et al.*, 2007).

Não existe cepa de bactéria com a capacidade metabólica individual para degradar todos os componentes do petróleo. Organismos individuais podem somente metabolizar limitados tipos de substratos hidrocarbonetos, dessa forma, populações mistas com amplas capacidades enzimáticas são requeridas para degradar misturas complexas de hidrocarbonetos (LEAHY; COLWELL, 1990; MERCURIO; BURNS; NEGRI, 2004).

Na natureza, a biodegradação de óleo cru tipicamente envolve a sucessão de espécies dentro de um consórcio microbiano, de maneira que microrganismos classificados como não utilizadores de hidrocarbonetos podem desempenhar uma função importante na eventual remoção de petróleo do ambiente. Assim, a degradação de petróleo envolve reações progressivas ou seqüenciais, em que certos microrganismos podem realizar o ataque inicial dos constituintes do petróleo, produzindo compostos intermediários que serão subsequentemente utilizados por um diferente grupo de organismos, o que resultará na biodegradação (VENOSA; ZHU, 2003).

Os manguezais provêm um ambiente ecológico único para diversas comunidades bacterianas. Esses microrganismos preenchem um variado número de nichos e são fundamentais para o funcionamento desses habitats, sendo particularmente importantes no controle do ambiente químico do manguezal (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001). Florestas de mangue, frequentemente próximas a atividades humanas, são ambientes muito ricos em matéria orgânica e têm acumulado grandes quantidades de poluentes antropogênicos. Dessa forma, não é surpreendente que microrganismos presentes no manguezal tenham evoluído e

desenvolvido habilidades para utilizar compostos orgânicos tais como hidrocarbonetos do petróleo (ATLAS, 1981).

Ramsay *et al.* (2000) reportaram que um grande número e uma ampla diversidade de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos aromáticos e alcanos foram encontrados em solos de manguezal, possuindo um considerável potencial para degradar componentes do petróleo, e que o número pode ser aumentado pela adição de óleo. Brito *et al.* (2006) estudaram o potencial de microrganismos degradadores de pireno isolados de solos de manguezal da Baía de Guanabara para degradar hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos e observaram essa habilidade em várias cepas bacterianas, confirmando a grande diversidade microbiana existente em solos de manguezal com potencial para remediar solos contaminados por óleo. Estudos anteriores também avaliaram a biodegradabilidade de HPAs por culturas mistas e isolados individuais presentes em solos de manguezais com diferentes graus de contaminação por hidrocarbonetos. Entre os gêneros de bactérias testados podem ser citados *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus*, *Paracoccus* e *Acinetobacter* (TAM *et al.*, 2002; GUO *et al.*, 2005; YU *et al.*, 2005).

2.4.2. Principais fatores que influenciam a biodegradação

A biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo é um processo complexo que depende de algumas condições ambientais como temperatura, salinidade, pH, disponibilidade de oxigênio e nutrientes específicos, além das propriedades químicas e físicas e quantidade de óleo ou hidrocarbonetos presentes (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2003; HUA *et al.*, 2004).

A heterogeneidade composicional entre diferentes tipos de petróleo influencia na sua biodegradabilidade. Os hidrocarbonetos diferem em sua susceptibilidade ao ataque microbiano e, no passado, tem geralmente sido considerada a seguinte ordem de susceptibilidade decrescente: n-alcanos, alcanos ramificados, aromáticos de baixo peso molecular e alcanos cíclicos. No entanto, esse padrão não é considerado universal (LEAVY; COWELL, 1990). Em relação aos n-alcanos, acreditava-se que sua degradação seguia uma seqüência bem conhecida caracterizada pelo fato de que a taxa de degradação diminuía à medida que o peso molecular do composto alifático aumentava (OH; SIM; KIM, 2001). No entanto, estudos em genes de enzimas de degradação, como hidroxilase de alcanos, mostram que existe uma degradação simultânea de todos os alcanos independente do seu peso

molecular, e é simplesmente essa baixa taxa de degradação de alcanos de alto peso molecular que causa a ilusão de uma degradação seqüencial (HEAD; JONES; RÖLING, 2006).

Além disso, componentes do petróleo com alta solubilidade em água apresentam sua taxa de degradação proporcional à concentração do composto, no entanto, para hidrocarbonetos insolúveis, a mineralização está mais relacionada à sua solubilidade aquosa do que a concentração total do substrato, pois vai depender da área superficial do hidrocarboneto disponível para emulsificação ou adesão (fixação) física pelas células microbianas (LEAVY; COWELL, 1990).

A temperatura desempenha uma função muito importante na biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo, primeiramente pelo seu efeito direto na química dos poluentes e também pelo seu efeito na fisiologia e diversidade da população microbiana (OKOH, 2006). Em geral, à baixa temperatura, a viscosidade do óleo aumenta, enquanto a volatilização dos hidrocarbonetos tóxicos de peso molecular mais baixo é reduzida, o que leva a um processo de biodegradação mais lento (ATLAS, 1981). Apesar da biodegradação de hidrocarbonetos poder ocorrer a uma ampla faixa de temperaturas, a taxa de biodegradação geralmente diminui com o decréscimo da temperatura (VENOSA; ZHU, 2003). Tipicamente o metabolismo dos hidrocarbonetos é máximo à temperatura de 30-40 °C (ROSATO, 1997). No entanto, em ambiente em que populações de bactérias psicrófilas estão estabelecidas, a degradação pode ocorrer a temperaturas tão baixas quanto 0-2 °C na água do mar e -1,1 °C em solos (VENOSA; ZHU, 2003).

Muitos fungos e bactérias heterotróficos têm seu crescimento favorecido sob condições de pH próximas à neutralidade, com os fungos sendo mais tolerantes a condições ácidas. Dessa forma, estudos têm mostrado que a biodegradação de óleo aumenta com a elevação do pH, e que a degradação ótima ocorre sob condições levemente alcalinas (VENOSA; ZHU, 2003).

Condições aeróbias são geralmente consideradas necessárias para degradação de hidrocarbonetos do petróleo em ambientes, já que as principais rotas degradativas para hidrocarbonetos aromáticos e saturados envolvem oxigenases. A disponibilidade de oxigênio em solos é dependente da taxa de consumo microbiano, tipo de solo e quantidade de substratos disponíveis. No entanto, estudos recentes têm apresentado que o metabolismo anaeróbio de hidrocarbonetos pode ser um processo importante sobre condições de anóxia (LEAVY; COWELL, 1990; VENOSA; ZHU, 2003).

Quando um derramamento de óleo ocorre no ambiente, o suprimento de carbono é drasticamente aumentado e a disponibilidade de nitrogênio e fósforo geralmente torna-se um

fator limitante para a biodegradação (LEAVY; COWELL, 1990; VENOSA; ZHU, 2003). Dessa forma, a adição de fertilizantes contendo fósforo e nitrogênio pode estimular a degradação de hidrocarbonetos pelos microrganismos (ATLAS, 1981; ROSATO, 1997).

Mudanças na salinidade podem afetar a degradação de óleo através da alteração da população microbiana. Em relação aos manguezais, pesquisas sugerem que em solos desses ambientes a taxa de degradação de hidrocarbonetos pela comunidade microbiana é provavelmente limitada pela concentração de oxigênio, níveis de nutrientes e variações de salinidade (SCHERRER; MILLE, 1989; TAM *et al.*, 2002).

2.4.3. Aspectos genéticos da biodegradação

A introdução de hidrocarbonetos no ambiente, durante os últimos anos, tem resultado na evolução de novos mecanismos adaptativos em bactérias para a biodegradação de poluentes orgânicos. Técnicas independentes de cultivo para análise do potencial metabólico e genético de comunidades microbianas modelo e naturais que degradam esses poluentes têm identificado novas rotas metabólicas e enzimas para degradação aeróbia e anaeróbia (TAN, 1999; PIEPER; MARTINS DOS SANTOS; GOLYSHIN, 2004).

Em uma resposta adaptativa típica a compostos orgânicos, nenhuma biodegradação ocorre imediatamente após a primeira exposição da comunidade microbiana ao composto. Entretanto, após um período, que varia de horas a meses, a mineralização inicia-se, pois muitos microrganismos, em particular bactérias, podem se adaptar e utilizar tais compostos como fonte de carbono e energia. Esta versatilidade bioquímica é em grande parte devido à plasticidade do genoma microbiano. Pela modificação de genes existentes, uma nova capacidade metabólica pode ser desenvolvida, o que permite que os xenobióticos sejam metabolizados (TAN, 1999, VAN DER MEER *et al.*, 1992).

Fatores genéticos desempenham importantes funções em conferir potencial de biodegradação aos microrganismos (OKOH, 2006). Os genes responsáveis pelas rotas de degradação são usualmente arranjados em agrupamentos que compreendem: genes catabólicos, que codificam passos enzimáticos de rotas catabólicas; genes transportes, responsáveis pela entrada ativa do composto; e genes regulatórios, que ajustam a expressão de genes catabólicos e transporte para a presença do composto a ser degradado (DÍAZ, 2004).

Os agrupamentos de genes catabólicos estão usualmente presentes em elementos genéticos móveis, tais como transposons e plasmídeos, que facilitam sua transferência horizontal e dessa forma, uma rápida adaptação dos microrganismos a presença de novos

poluentes em um ecossistema particular (DÍAZ, 2004). Os plasmídeos possuem papel importante neste aspecto. Exposições de comunidades microbianas a hidrocarbonetos têm apresentado um aumento no número de tipos de plasmídeos bacterianos. Assim, plasmídeos catabólicos são elementos genéticos não essenciais, na medida em que a viabilidade e reprodução do organismo não dependem deles, mas provêm uma versatilidade metabólica normalmente ausente na célula. Tal potencial genético permite a evolução de rotas reguladas e integradas para a degradação de hidrocarbonetos (OKOH, 2006).

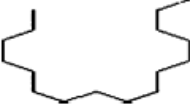
2.4.4. Biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos – Os n-alcenos

Devido aos hidrocarbonetos alifáticos constituírem a maior fração do óleo cru por volume, principalmente os alcanos de C₁₄-C₂₀, a biodegradação desses hidrocarbonetos é quantitativamente o mais importante processo na remoção do óleo cru do ambiente (HEAD; JONES; RÖLING, 2006). Assim, apesar dos contaminantes aromáticos receberem uma maior atenção nas pesquisas, esta classe representa apenas menos de 5% do volume (STROUD; PATON; SEMPLE, 2007).

Os hidrocarbonetos alifáticos exibem baixas reatividade química e biodisponibilidade para os microrganismos, devido à falta de grupos funcionais e pouca solubilidade na água. Entretanto, algumas bactérias e fungos possuem a capacidade metabólica para usar esses compostos como fontes de carbono e energia para crescer (BERTHE-CORTI; FETZNER, 2002).

O n-Hexadecano está presente na fração alifática do óleo cru e é um dos principais componentes do diesel (CHÉNIER *et al.*, 2003). Devido a sua presença em muitos locais contaminados e a sua demonstrada e bem conhecida biodegradabilidade por distintas populações microbianas, este composto tem sido usado como molécula modelo para estudar a biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos (GRAHAM *et al.*, 1999; SCHOEFS; PERRIER; SAMSON, 2004). As propriedades físico-químicas do n-Hexadecano estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do n-Hexadecano (adaptado de STROUD *et al.*, 2007).

Estrutura química	
Fórmula molecular	C ₁₆ H ₃₄
Peso molecular (g/mol)	226,44
Ponto de fusão	18 °C
Ponto de ebulição	287 °C
Solubilidade (mg/L)	0,00628
Log Kow	9,1

2.4.5. Rotas de biodegradação aeróbia de n-alcenos

As rotas catabólicas microbianas para degradação de n-alcenos de uma ampla variedade de bactérias, fungos filamentosos e leveduras têm sido bioquimicamente caracterizadas. Estas incluem as rotas de hidroxilação comuns, tais como as rotas de oxidação terminal, seguida ou não por uma ω -oxidação e a menos comum rota de oxidação subterminal (WATKINSON; MORGAN, 1990), como apresentadas na figura 2.

Na oxidação terminal, o passo de oxidação inicial é catalisado por uma enzima monooxigenase a um álcool primário, que é oxidado mais adiante ao aldeído correspondente através de uma álcool desidrogenase e então para o ácido graxo correspondente através de uma aldeído desidrogenase. Na rota de oxidação subterminal, o n-alceno é oxidado por uma monooxigenase ao álcool secundário correspondente, então para cetona, e eventualmente a ácido graxo. Sistemas de dioxigenase também existem em alguns microorganismos onde o n-alceno é oxidado inicialmente ao hidroperóxido correspondente e então é transformado ao álcool primário ou para o aldeído correspondente (WATKINSON; MORGAN, 1990; WHITE *et al.*, 1998).

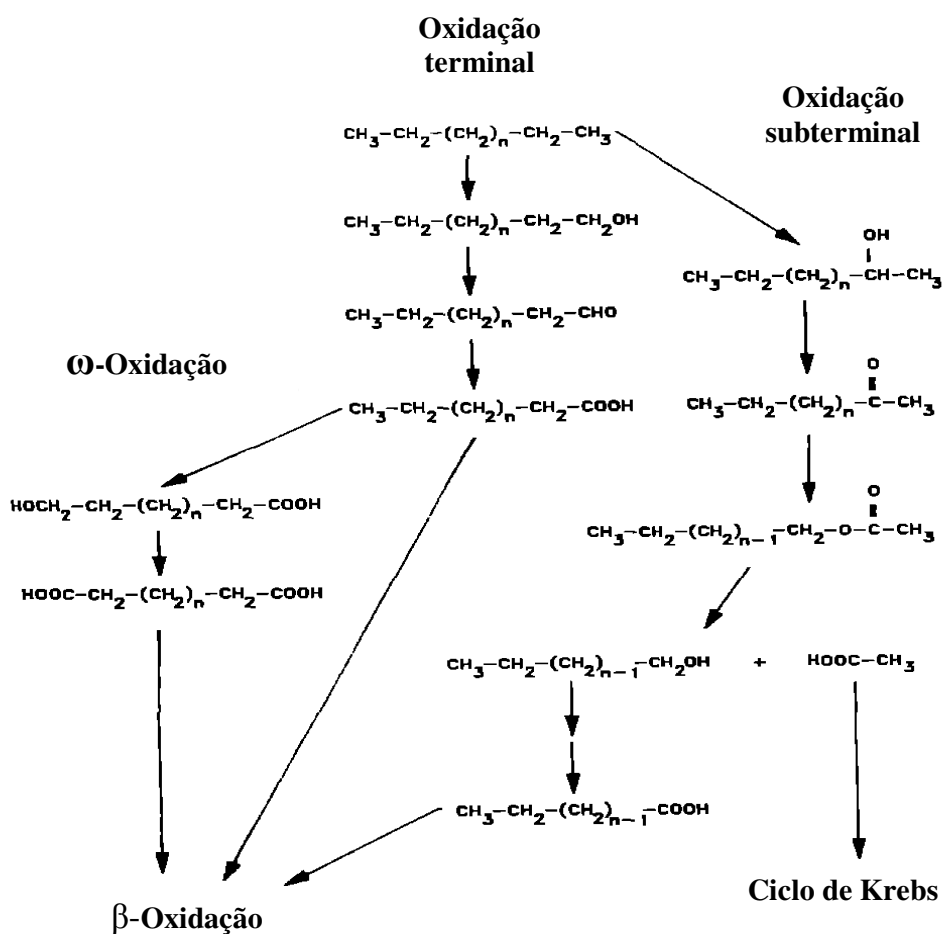


Figura 2. Rotas metabólicas básicas para degradação de n-alcanos. Apresentando as três principais rotas documentadas para microrganismos: oxidação terminal, oxidação terminal seguida por ω-Oxidação e oxidação subterminal (WATKINSON; MORGAN, 1990).

2.5. Biorremediação - Técnicas utilizadas em manguezais

Vários processos físico-químicos e biológicos têm sido utilizados na remoção de hidrocarbonetos de petróleo em solos e dissolvidos na água. No entanto, as mais recentes e promissoras técnicas são as baseadas em biodegradação. A biorremediação é uma tecnologia barata, segura e ambientalmente correta, que continua sendo mais usada e pesquisada para a descontaminação de solos e aquíferos contendo compostos tóxicos (CORSEUIL; MARINS, 1997; MOLNAR *et al.*, 2002). Este processo biológico pode ser descrito como a conversão de compostos químicos por organismos viáveis em massa celular e produtos residuais biológicos inócuos a saúde. Para os hidrocarbonetos do petróleo, seus produtos finais biológicos são CO_2

e água (WALTER *et al.*, 1997). No entanto, em comparação com tratamentos físicos e químicos, a biorremediação exige um tempo mais longo. Meses ou anos podem ser necessários para reduzir a contaminação a níveis aceitáveis (MOLNAR *et al.*, 2002).

O objetivo principal da biorremediação é minimizar o impacto das substâncias recalcitrantes no ambiente, criando condições favoráveis ao crescimento e à atividade dos microrganismos. A biorremediação pode ser efetuada *in situ* ou *ex situ*. As tecnologias *ex situ* removem fisicamente o material contaminado para outra área, onde é realizado o tratamento. As técnicas *in situ* envolvem o tratamento do material contaminado no próprio local, sendo geralmente uma das opções mais desejáveis devido ao mais baixo custo e a menor perturbação no ambiente, já que evita escavação e transporte de contaminantes (VIDALI, 2001). Para aumentar a eficiência da degradação, três estratégias de remediação *in situ* conhecidas como atenuação natural, bioaumento e bioestímulo, têm sido propostas (IWAMOTO; NASU, 2001).

A atenuação natural utiliza a capacidade intrínseca dos microrganismos autóctones para degradar contaminantes e é um processo de degradação natural (MILLS *et al.*, 2003). Esta estratégia é vantajosa, pois evita danificar habitats de manguezal sensíveis ecologicamente (DOWTY *et al.*, 2001). Entretanto, essa biorremediação intrínseca leva longo tempo para se completar devido ao tamanho da população de microrganismos degradadores indígenas ser geralmente baixo.

O bioaumento, inoculação de microrganismos indígenas ou exógenos com capacidade de degradação desejada, é um meio possível para aumentar a biodegradabilidade de contaminantes tóxicos (VOGEL, 1996). No entanto, dois fatores limitam o seu uso, pois raramente culturas de microrganismos exógenos competem bem o bastante com a população microbiana indígena para que efetivamente degradem os contaminantes, além disso, a maioria dos solos com exposição a longo prazo aos poluentes têm microrganismos que são adaptados a degradação (VIDALI, 2001). Dessa forma, o bioaumento tem vantagens claras em casos onde a toxicidade do poluente ou a falta de microrganismos apropriados (quantidade e qualidade) é importante (VOGEL, 1996; IWAMOTO; NASU, 2001).

O bioestímulo, provendo nutrientes ou oxigênio para estimular a degradação de microrganismos nativos, é outra estratégia para promover a biodegradação, especialmente em ambientes tais como solos de manguezais onde os principais fatores limitantes da biodegradação são os baixos níveis de oxigênio molecular e a eventual baixa concentração de nutrientes (BURNS *et al.*, 1999). No entanto, a respiração sub-superficial das raízes de árvores de manguezal e a escavação dos animais bentônicos podem ser mecanismos efetivos

para prover naturalmente oxigênio aos sedimentos anóxicos do manguezal, além disso, a preservação do sistema de raízes complexo e denso é crucial à sobrevivência das árvores (BURNS; CODI; DUKE, 2000).

Ramsay *et al.* (2000) testaram duas estratégias de biorremediação em solos de manguezal que consistiram de aeração e adição de nutrientes e detectaram que ambas as técnicas estimularam o crescimento de microrganismos degradadores, podendo assim ser consideradas estratégias efetivas para acelerar a degradação de óleo neste ambiente. No entanto, Burns, Codi e Duke (2000) realizaram um estudo de campo semelhante e observaram que nos solos de manguezal não houve diferença significativa na concentração inicial, penetração ou taxa de dissipação do óleo entre as metodologias de biorremediação aplicadas e no controle sem tratamento, sendo detectada a importância da degradação microbiana em modificar as frações de alcanos somente após dois meses de tratamento.

Dessa forma, resultados observados em vários trabalhos de campo sugerem que o sucesso da biorremediação em casos específicos depende das propriedades do óleo, o tipo de estratégia escolhida de biorremediação e as características dos ambientes contaminados (BALBA; AL-AWADHI; AL-DAHER, 1998; VENOSA; ZHU, 2003).

2.6. A exploração de petróleo em Icapuí

A região costeira de Icapuí localiza-se próximo a instalações de plataformas de petróleo da Bacia Potiguar, inclusive o campo de exploração petrolífera da Fazenda Belém que fica na região de Icapuí e Aracati (SILVA, 2005). Esse campo de exploração apresenta uma área de 144 quilômetros quadrados com 452 poços, que produzem atualmente dois mil barris de petróleo por dia. A SEMACE (Superintendência Estadual de Meio Ambiente) interditou alguns poços de petróleo dessa fazenda em decorrência de possíveis danos ambientais à região nos últimos 20 anos. O primeiro derramamento foi reportado pela Petrobras em 1996 com o vazamento de oito mil litros de petróleo. Em maio de 2003, ocorreu outro acidente com uma quantidade de petróleo que atingiu a vegetação e o solo numa área de dois hectares. Exatamente um ano depois, poços de petróleo da Fazenda Belém foram interditados por suspeita de crime ambiental, pois a SEMACE verificou a existência de pelo menos 6.000 toneladas de resíduos sólidos de petróleo depositados de forma irregular, além do lançamento de três milhões de litros de efluente água-óleo em locais inapropriados, como cavas superficiais permeáveis, causando a contaminação do solo e provavelmente também do

lençol freático. Assim, essas águas subterrâneas podem levar as substâncias contaminantes para ecossistemas aquáticos, como o manguezal da Barra Grande.

Dessa forma, a exploração de petróleo em Icapuí é uma atividade que vem crescendo e que traz riscos de contaminação ao ambiente, apresentando grande possibilidade de expansão até em áreas situadas a 3 quilômetros da faixa de praia, pois essa região apresenta um grande potencial para exploração de poços de petróleo. Além disso, no início de 2007, houve um derramamento de origem desconhecida, que atingiu as praias do litoral do Ceará e Rio Grande do Norte, inclusive as praias de Icapuí.

Com base no exposto, ecossistemas costeiros da região de Icapuí, principalmente o manguezal da Barra Grande que é extremamente sensível à poluição por óleo, pode ser considerado como área de risco, o que reforça a importância de estudos da microbiota autóctone desse ambiente em relação à resposta a contaminação por petróleo para uma posterior aplicação em atividades de biorremediação.

3. OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve por objetivo proceder à caracterização e isolamento de bactérias de solo de manguezal com potencial para degradar petróleo e seus derivados, através da combinação de técnicas seletivas tradicionais e moleculares, e avaliar a aplicabilidade desses microrganismos para futura utilização em atividades de biorremediação.

3.1. Objetivos específicos

- Caracterizar as amostras de solo do manguezal da Barra Grande (Icapuí, CE) quanto à granulometria e teor de matéria orgânica e realizar medidas em campo de variáveis ambientais, como temperatura, pH e salinidade;
- Caracterizar a comunidade bacteriana dos solos através da análise do Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição Terminal (T-RFLP);
- Isolar microrganismos autóctones de amostras de solo do manguezal da Barra Grande (Icapuí, CE), através de enriquecimento em meio mínimo com petróleo;
- Selecionar espécies degradadoras de n-Hexadecano;
- Realizar ensaios de biodegradação com as cepas selecionadas;
- Identificar as cepas e avaliar o potencial para utilização em biorremediação.

4. METODOLOGIA

4.1. Área de estudo

O Manguezal da Barra Grande (Fig. 3 e 4) localiza-se no Município de Icapuí, extremo litoral leste do Estado do Ceará (37° 20'W, 4° 40'S), em uma região formada por uma extensa planície de maré. Esse manguezal foi reconhecido como Área de Proteção Ambiental através da Lei Municipal N° 298/00 de 12 de maio de 2000 e abrange 1.260,31 hectares.



Figura 3. Localização do manguezal da Barra Grande, Icapuí (Ceará), mostrando em detalhe os pontos de coleta. Imagem modificada do software *Google Earth*.



Figura 4. Vista geral da planície de maré e manguezal da Barra Grande durante a maré baixa.

4.2. Coleta das amostras de solo

A amostragem do solo do manguezal da Barra Grande (Icapuí – CE) foi realizada no dia 9 de outubro de 2006 às 12 horas durante a maré baixa com amplitude 0.1. Foram coletados solos em 3 pontos diferentes a profundidades de 0 a 10 cm, em um transecto perpendicular a linha de costa, sendo a primeira amostra coletada no ponto 1 (P1) mais próxima à praia, a terceira amostra do ponto 3 (P3) mais próxima ao continente e a segunda amostra do ponto 2 (P2), localizada entre eles (Fig. 3). Em cada ponto, cinco amostras de solo foram retiradas em uma área de 1 m² com a utilização de um amostrador cilíndrico de PVC de 10 cm de diâmetro (Fig. 5) e transferidas para frascos estéreis. A distância entre os pontos P1 e P3 foi de 300 m. Os pontos de coleta foram georeferenciados com o uso de um GPS portátil. As amostras de solos foram então conduzidas ao laboratório em uma caixa resfriada com gelo para manter a condição em torno de 4-8 °C. Os solos frescos foram usados imediatamente para isolamento de microrganismos, subamostras dos solos foram armazenadas a -20 °C para posterior extração de DNA e o restante foi utilizado para realização das análises de granulometria e determinação de matéria orgânica. Variáveis ambientais da água de percolação dos solos como pH, salinidade e temperatura foram medidos diretamente em campo, utilizando uma sonda multiparâmetro, modelo 650, marca YSY.



Figura 5. Procedimento de coleta de solo com amostrador cilíndrico.

4.3. Análise granulométrica e teor de matéria orgânica

As análises granulométricas foram realizadas na Divisão de Oceanografia Abiótica do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará (UFC), utilizando a metodologia de peneiramento proposta por Suguio (1973). As amostras foram secas a 60 °C antes de ser realizado o fracionamento em 100 g de cada uma delas. Posteriormente, essas amostras seguiram para o mecanismo de peneiramento úmido, o qual separa a fração lamosa da arenosa (limites das classes = 0,062 mm de diâmetro). Após nova secagem a 60 °C, a fração arenosa foi submetida a peneiramento mecânico em um conjunto de 12 peneiras, onde se separam as classes arenosas e cascalhos, ou seja, frações de 0,062 a 2,00 mm. Ao final desse procedimento, pesou-se o conteúdo de cada peneira. Esses resultados foram processados no programa de análise granulométrica ANASED 5j, desenvolvido no Laboratório de Geologia Marinha e Aplicada – UFC. A classificação nominal foi dada segundo Folk e Ward (1957) e as porcentagens de cascalho, areia, silte e argila na escala de Wentworth (1922).

A determinação do teor de matéria orgânica foi feita pelo método de perda de peso por ignição (PPI), descrita em Schulte e Hopkins (1996). Para tanto, foram calcinados 0,5 g de solo, em triplicata, em mufla a 550 °C por 4 horas. As amostras foram resfriadas em

dessecador por 2 horas, antes de serem pesadas. O teor de matéria orgânica foi calculado pela equação:

$$\% \text{ MO} = (P_i - P_f / P_i) * 100$$

Onde:

% MO = matéria orgânica em percentagem;

P_f = massa após ser submetida à combustão;

P_i = massa total ou inicial.

4.4. Determinação do tamanho e diversidade de comunidades de bactérias de solos de manguezal

As análises das comunidades bacterianas foram feitas através da análise do Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição Terminal (T-RFLP), seguindo o protocolo descrito por Marsh (2005).

A extração do DNA total dos solos foi feita com o *kit Power Soil DNA Isolation* (Mobio, USA, Catálogo n° 12888-50), seguindo o protocolo do fabricante. Os DNAs obtidos foram precipitados por tratamento com 2 µL de uma solução de cloreto de sódio 5 M e 100 µL de etanol puro gelado. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 g por 5 minutos e os precipitados secos ao ar. As amostras de DNA foram amplificadas por PCR utilizando os iniciadores 63F (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC) marcado com o fluoróforo 6-carboxifluoresceína na extremidade-5' (63F-6-FAN) e 1389R (5'-ACG GGC GGT GTG TAC AAG), seguindo sugestão de Osborn, Moore e Timmis, 2000.

As PCRs foram realizadas de acordo com o seguinte programa: desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos; seguido de 25 ciclos para amplificação nas seguintes condições: 94 °C por 1 minuto; 55 °C por 1 minuto; 72 °C por 2 minutos, e um passo de extensão final a 72 °C por 10 minutos. As quantidades dos reagentes da PCR estão descritas na tabela 2. O tampão PCR 10X tem a seguinte composição: 500 mM de KCl e 200 mM de Tris-HCl (pH 8,4). Após a reação de PCR os produtos foram purificados em kit comercial *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, USA, Catálogo n° 28104) seguindo-se as recomendações do fabricante. Posteriormente, essas amostras foram digeridas separadamente com as enzimas de restrição *HhaI* e *MspI* (New England Labs, USA, Catálogo n° R0139L e n° R0106L respectivamente) para obtenção dos fragmentos de restrição terminal. Os componentes da

reação estão descritos na Tabela 3. O tampão 10X utilizado tem a seguinte composição: 100 mM de Tris-HCl, 500 mM de NaCl, 100 mM de MgCl₂ e 10 mM de DTT (ditiotreitól). A digestão ocorreu a 37 °C durante 3 horas, após o que a reação foi parada aquecendo-se os tubos a 65 °C durante 20 minutos. As digestões foram feitas com os tubos recobertos por papel alumínio e sempre no escuro, para evitar perda de fluorescência. Os produtos da digestão foram secos a 40 °C e enviados para o Laboratório de Suporte Tecnológico para Pesquisas do Departamento de Biologia de Plantas da Universidade Estadual de Michigan (USA), onde os perfis de T-RFLP foram gerados.

Tabela 2. Formulação usada nas PCRs.

Componente	Quantidade
Tampão PCR10X	5,0 µL
MgCl ₂ 50 mM	2,0 µL
dNTPs 10 mM	1,0 µL
Iniciador 63F 10 µM	2,0 µL
Iniciador 1389R 10 µM	2,0 µL
Taq DNA polimerase	2 U
DNA genômico	20 ng
H ₂ O q.s.p.	50 µL

Tabela 3. Composição da reação para digestão com *MspI* ou *HhaI*.

Componente	Quantidade
Tampão 10X	1,5 µL
DNA 200ng	X Volume
<i>MspI</i> ou <i>HhaI</i> 10 U	0,5 µL
Água pura q. s. p.	15 µL

A análise dos fragmentos foi realizada usando 2 µL da digestão com 8 µL de uma solução contendo o padrão interno MapMakerTM 1000 (Bioventures Inc., USA) marcado com ROX (6-carboxi-X-rodamina) e o tampão de corrida (formamida deionizada), nos modos de 5 e 50 unidades de fluorescência. Os fragmentos de DNA foram detectados por eletroforese capilar em um seqüenciador automático *ABI 3100 Prism Genetic Analyser* (Applied Biosystems, USA). Os perfis de TRFLP foram visualizados com o uso do *software*

GeneScan Analysis (Applied Biosystem), exportados para o Excel e analisados com ferramentas do IBEST (<http://www.ibest.uidaho.edu/tools/index.php>), usando como ponto inicial de altura 5 unidades de fluorescência para a análise dos eletroferogramas e filtrados no programa R (<http://www.rproject.org>) pelo algoritmo *Gfiltering* com um desvio padrão de três réplicas. Dois comprimentos do fragmento que estavam com diferença de 1 par de bases foram considerados ter o mesmo comprimento. Os arquivos foram exportados do IBEST e analisados pela ferramenta T-Align (<http://inismor.ucd.ie/~talign/index.html>). As matrizes geradas no T-Align foram analisadas pelo programa "R" (<http://www.r-project.org/>).

4.5. Isolamento e seleção de bactérias por método de enriquecimento

O enriquecimento foi realizado em frascos Erlenmeyers contendo 225 mL de meio mineral Bushnell e Haas - BH (1941), cuja composição encontra-se na tabela 4. Este meio recebeu 2 % de NaCl (meio BH-salino) (RAMSAY *et al.*, 2000; CHAERUN *et al.*, 2004), referente a uma salinidade de 25, sendo esterilizado em autoclave a 121° C, por 15 min. Após resfriamento foram adicionados assepticamente 0,1 % de uma solução de micronutrientes (v/v), esterilizada em membrana filtrante (0,22 m, Millipore), em substituição a 2 gotas de solução concentrada de FeCl₃. A composição da solução de micronutrientes encontra-se na tabela 5. Vinte cinco gramas de solo de cada ponto da área de estudo foram inoculados nos frascos contendo o meio BH-salino e incubados a 32 °C com agitação a 160 rpm.

Após dez dias de incubação, 10 mL de cada uma das culturas foram transferidos para 90 mL de meio mineral BH salino, agora enriquecido com 1 % de petróleo (p/v) proveniente da Fazenda Belém, Icapuí, CE, que apresenta uma fração de hidrocarbonetos saturados em torno de 55% (LOPES, 1995). Essas culturas foram mantidas a 32 °C sob agitação a 160 rpm e quinzenalmente foram preparados subcultivos, nas mesmas condições, durante um período de 60 dias. Ao final de cada período de incubação, as culturas enriquecidas eram semeadas em PCA (Agar para contagem em placas, Difco) contendo 2 % de NaCl. Após o período de incubação, as placas eram analisadas quanto às características culturais e as colônias distintas subcultivadas para obtenção de culturas puras. As cepas isoladas dessa maneira foram armazenadas em Agar Nutritivo (Difco) em camada alta com 2 % NaCl, sob óleo mineral, a 4 °C.

Tabela 4. Composição do meio mineral Bushnell e Haas (1941).

Componente	Quantidade
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20 g
CaCl ₂	0,02 g
K ₂ HPO ₄	1,00 g
KH ₂ PO ₄	1,00 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00 g
Água destilada	1000 mL
pH 7,5	

Tabela 5. Composição da solução de micronutrientes.

Componente	Quantidade
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10,95 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,00 g
MnSO ₄ .H ₂ O	1,54 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,39 g
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,25 g
Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	0,17 g
Água destilada	1000 mL

4.6. Seleção de bactérias degradadoras de n-Hexadecano

As culturas puras obtidas dos ensaios de enriquecimento com petróleo foram cultivadas em meio com n-Hexadecano, um padrão de hidrocarboneto alifático, na concentração de 7,7 g/L (ou 1% v/v), como única fonte de carbono (KIM; FOGHT; GRAY, 2002).

Para tanto, os isolados foram cultivados em 30 mL de Caldo Nutritivo com 2 % NaCl, por 24 h a 32 °C, sob agitação de 160 rpm. As culturas foram centrifugadas a 10.000 g (Sigma 6-15, USA) durante 15 minutos a 22 °C, sob condições assépticas. Os precipitados foram submetidos a duas lavagens com solução de NaCl 0,9 % estéril, sob centrifugação a 10.000 g por 10 min. Ao final, os precipitados foram ressuspensos em meio BH-salino e ajustados para uma absorbância equivalente a uma densidade celular de $10^7 - 10^8$ ufc/mL. Um

volume de 1 ml das suspensões foi usado para inocular tubos contendo 9 mL de meio BH-salino. Os tubos foram mantidos sob agitação ininterruptamente a 160 rpm, em agitador rotativo (*shaker*), à temperatura de 32 °C. Imediatamente após a inoculação (tempo zero) e depois nos tempos de 48 e 96 horas de incubação foram retiradas alíquotas para avaliação da biomassa através de medidas de absorvância a 600 nm. Os ensaios foram feitos em triplicata com pelo menos duas repetições.

4.7. Avaliação da biodegradação de diferentes concentrações de n-Hexadecano por linhagens bacterianas selecionadas

O estudo de biodegradação foi realizado em frascos Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio mineral BH-salino contendo 10 % (77 g/L) de n-Hexadecano como única fonte de carbono, com as cepas selecionadas como descrito no item anterior. A cepa que apresentou melhor desempenho foi utilizada em novos ensaios com n-Hexadecano a 15 % (115,5g/L) e 20 % (154 g/L). As culturas foram monitoradas por 96 horas através de medidas de pH, absorvância e quantificação de n-Hexadecano residual. Os ensaios foram feitos em triplicata com pelo menos duas repetições.

4.8. Avaliação da biodegradação de n-Hexadecano por cromatografia gasosa

A quantificação de n-Hexadecano residual nas culturas foi feita por Cromatografia Gasosa (CG) na Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará (NUTEC). Para as análises, culturas iniciais (tempo 0) e com 48 horas foram centrifugadas a 10.000 g por 10 min a 22 °C (Sigma 6-15, USA) e os sobrenadantes extraídos com Diclorometano (Merk) na proporção 1:3 (v/v), sob agitação vigorosa durante 60 segundos. O cromatógrafo Trace GC Ultra (Thermo Scientific), equipado com detector de ionização por chama (DIC) e coluna capilar OV-5 (30 m x 0,25 mm DI x 0,25 µm de espessura do filme) foi utilizado com hidrogênio como gás de arraste e temperaturas de injeção e detecção de 220 °C e 280 °C, respectivamente. Foi injetado 1 µL de cada sobrenadante no modo *split* e as medidas foram iniciadas a 100 °C, aumentando-se a temperatura até 230 °C, com uma taxa de aquecimento de 25 °C/min. Os ensaios foram feitos em triplicata.

4.9. Avaliação da hidrofobicidade celular

A hidrofobicidade da cepa selecionada foi avaliada de acordo com o método descrito por Kim, Foght e Gray, 2002. A cepa foi cultivada em Caldo Nutritivo (Difco) com 2 % NaCl, por 24 h a 32 °C sob agitação constante. A cultura foi centrifugada a 10.000 g (Sigma 6-15, USA) durante 15 minutos a 22 °C, sob condições assépticas. O precipitado foi submetido a duas lavagens com meio mineral BH-salino estéril, sob centrifugação a 10.000 g por 10 min. Ao final, o precipitado foi ressuscitado em meio BH-salino e ajustado para uma absorbância 0,1 a 600 nm, equivalente a uma densidade celular de 10^7 ufc/mL. Alíquotas de 3 mL dessa suspensão celular foram transferidas para tubos contendo 0,1; 0,2; 0,3; 0,6 e 1,0 mL de n-Hexadecano puro. Após incubação a 32 °C por 10 minutos, os tubos foram agitados por 2 minutos em *vortex* e deixados em repouso por 15 min. A fase aquosa foi cuidadosamente recuperada para realização das leituras de absorbância a 600 nm. Esses ensaios foram feitos em triplicata com pelo menos duas repetições. O percentual de hidrofobicidade (% H) foi obtido a partir da fórmula:

$$\% H = 100 \times [1 - (\text{DO}_{600} \text{ depois da mistura} / \text{DO}_{600} \text{ antes da mistura})].$$

Onde:

DO_{600} = densidade óptica a 600 nm

4.10. Atividade de emulsificação

A produção de emulsificantes pela cepa selecionada foi averiguada pelo teste de emulsificação de uma mistura óleo-água, descrito por Iqbal, Khalid e Malik (1995). O teste consiste 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 minutos. Em seguida, os tubos são deixados em repouso por 24 horas, à temperatura ambiente, e o percentual de emulsificação (E24 %) é calculado dividindo-se a altura da camada emulsificada (mm) pela altura total da camada de líquido (mm), multiplicando-se por 100. Para facilitar a visualização das fases são acrescentados 200 µL de uma solução a 0,05 % do corante Rosa Bengala, antes da agitação. Os ensaios foram feitos em triplicata com pelo menos duas repetições.

4.11. Avaliação da susceptibilidade a antibióticos e a radiação ultravioleta

A avaliação da susceptibilidade a antibióticos foi feita segundo a metodologia descrita por Bauer *et al.* (1966). Inicialmente, a cultura de bactéria selecionada foi cultivada em Caldo Nutritivo 2 % NaCl por 24 horas a 32 °C, após o que sua absorbância foi ajustada para 0,1 a 600 nm, equivalente a 10^7 ufc/mL. Essa cultura foi semeada com auxílio de *swab* estéril em placas de Agar Müller-Hinton (Difco) e discos de antibióticos comerciais (CECON, São Paulo, Brasil) foram colocados sobre o meio com uma pinça estéril. As placas foram incubadas a 32 °C por 24 horas e então, foram medidos os halos de inibição formados em torno dos discos de antibióticos e os valores foram comparados com medidas de referências aprovadas pela Sociedade Brasileira de Microbiologia (2005) para classificar os microrganismos como resistentes ou sensíveis aos antimicrobianos. Foram testados os seguintes antibióticos: Tetraciclina (30 µg), Cloranfenicol (30 µg), Estreptomicina (10 µg), Penicilina G (10 µg), Rifampicina (5 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Eritromicina (15 µg) e Sulfazotrim (25 µg). Os ensaios foram feitos em triplicata com pelo menos duas repetições.

Para avaliar o efeito da radiação ultravioleta, a cultura selecionada foi incubada em Caldo Nutritivo 2 % NaCl durante 24 horas a 32 °C e sua absorbância ajustada a 0,1 a 600 nm, equivalente a 10^7 ufc/mL. A cultura foi então semeada com auxílio de *swab* estéril em Agar Nutritivo e as placas foram irradiadas a 260 nm durante um tempo máximo de 8 minutos. A potência da lâmpada de UV era de 15W e a distância da lâmpada até a superfície da placa era de 5 cm. Em seguida, as placas foram incubadas a 32 °C por 24 horas para observação do surgimento de colônias, e comparadas com as placas controles, não irradiadas. Os ensaios foram feitos em triplicata com pelo menos duas repetições.

4.12. Identificação molecular da linhagem de bactéria selecionada

A bactéria selecionada como melhor degradadora de n-Hexadecano foi identificada pela seqüência do gene que codifica a região do rRNA 16S após a amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando os iniciadores 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) e 1525R (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC).

A metodologia de extração do DNA utilizou o reagente CTAB (Brometo de Cetiltriethylamônio) de acordo com o protocolo descrito em Foster e Twell (1996). Para tanto, uma colônia foi inoculada em Caldo Nutritivo suplementado com 2 % de NaCl, sendo mantida sob agitação durante aproximadamente 12 horas. Após esse período, a cultura foi

centrifugada por 3 minutos a 12.000 rpm, sendo o concentrado celular resultante lavado com 800 μ L de água grau Milli Q e centrifugado por mais 5 minutos a 12.000 rpm. O precipitado foi recuperado em 500-800 μ L de CTAB (CTAB 2%, Tris-HCl 100mM, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, pH 8) pré-aquecido a 60 °C contendo β -mercaptoetanol 0,2 % v/v, e incubados em banho-maria a 60 °C por 4 horas. Em seguida, foi adicionada uma solução de Clorofórmio-Álcool Isoamílico, na proporção 24:1 (v/v) e feita uma centrifugação a 12.000 rpm por 30 minutos. A fase aquosa foi recuperada em um novo tubo, onde foi acrescido 2/3 do volume de Isopropanol (100 %) e incubado em freezer. Após 12 horas, foi realizada uma centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos, seguida de uma lavagem com Etanol 70 % e nova centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi deixado à temperatura ambiente para evaporar o Etanol. A preparação foi ressuspensa em 75 μ L de Tris-EDTA (10 mM:1 mM, pH 8) acrescido de RNase a 20 μ g/mL. O rendimento da extração foi estimado pela medida da absorbância a 260 nm em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Posteriormente, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% para verificar a eficiência do processo e tamanho do fragmento amplificado.

As PCRs foram realizadas de acordo com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos; seguido de 34 ciclos para amplificação nas seguintes condições: 95 °C por 1 minuto; 50 °C por 15 segundos; 72 °C por 1 minuto, e um passo de extensão final a 72 °C por 9 minutos. As quantidades dos reagentes da PCR estão descritas na tabela 6. O tampão PCR 10X tem a seguinte composição: 500 mM de KCl e 200 mM de Tris-HCl (pH 8,4). Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o kit comercial *Ultra Clear PCR Clean-up* (Mobio, USA, Catálogo nº 12500-50) seguindo-se as recomendações do fabricante. A seqüência completa do produto de PCR purificado foi determinada usando-se o kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences, USA), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Nas reações de seqüenciamento, foram usados os iniciadores 27F, 1525R, 782R (5'-ACC AGG GTA TCT AAT CCT GT) e 1100R (5'-AGG GTT GCG CTC GTT G). Os produtos das reações de seqüenciamento foram analisados em um seqüenciador automático de DNA MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences, USA). A seqüência rDNA 16S completa foi montada a partir das seqüências parciais, obtidas com cada um dos iniciadores, com o programa Phrap. A seqüência obtida foi então comparada com aquelas depositadas em bancos públicos (GenBank + EMBL + DDBJ + PDB) usando o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Tabela 6. Formulação usada nas PCRs.

Componente	Quantidade
Tampão PCR10X	2,5 µL
MgCl ₂ 50 mM	1,0 µL
dNTPs 10 mM	0,5 µL
Iniciador 27F 0,5 µM	2,5 µL
Iniciador 1525R 0,5 µM	2,5 µL
Taq DNA polimerase	5 U
DNA genômico	200 ng/µL
H ₂ O q.s.p.	25 µL

4.13. Análises estatísticas

Os dados das curvas de crescimento das bactérias em n-Hexadecano foram testados quanto à normalidade, sendo comparados através de análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, com o programa STATISTICA versão 7.0.

Análises de agrupamento (modo Q – agrupamento de amostras) foram realizadas com os fatores abióticos utilizando como coeficiente de associação a distância euclidiana e a abundância relativa de fragmentos de restrição terminal, pela similaridade de Bray Curtis. O modo de visualização dos agrupamentos foi do tipo Associação Média Não Ponderada (UPGMA). Os índices de diversidade ecológica, Shannon (H' pelo \log_2), Simpson (λ), equitabilidade de Pielou (J') e riqueza de Margalef (d) foram medidos a partir dos dados de abundância relativa de ribotipos obtidos do T-RFLP de amostras de solo. Todas essas análises foram realizadas utilizando-se o programa PRIMER versão 6.0.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização das amostras de solo

As medidas de variáveis ambientais, teor de matéria orgânica e granulometria das amostras de solos dos diferentes pontos do manguezal estão apresentadas na tabela 7.

Tabela 7. Variáveis ambientais dos pontos de coleta e características gerais dos solos.

Pontos	1	2	3
Temperatura (°C)	31,18	31,01	34,6
pH	9,24	10,45	8,8
Salinidade	53,75	46,5	46
Cascalho (%)	0,19	1,27	0,97
Areia (%)	91,76	91,57	66,29
Silte + Argila (%)	8,05	7,16	32,74
Matéria orgânica (%)	2,36	2,75	8,36

Os solos do manguezal da Barra Grande foram caracterizados como areia fina nos pontos P1 e P2 e silte grosseira no ponto P3, apresentando este último uma alta fração silte-argila, além de um maior teor de matéria orgânica. Análise de agrupamento entre os pontos estudados, considerando os fatores abióticos citados na tabela 7, através da utilização da distância euclidiana como coeficiente de associação, está mostrada na figura 6. A partir desse dendrograma, pode-se observar uma maior semelhança entre os pontos P1 e P2, já que este grupo apresentou uma distância euclidiana menor que 10, enquanto o ponto P3 em relação aos pontos P1 e P2 apresentou uma distância em torno de 35.

5.2. Tamanho e diversidade das comunidades bacterianas de solos do manguezal

Os perfis das comunidades bacterianas de solos dos pontos P1, P2 e P3 do manguezal da Barra Grande derivados da análise de Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição Terminal (T-RFLP), utilizando a enzima de restrição *MspI*, estão mostrados na figura 7 e 8. Analisando essas figuras pode-se inferir que os solos diferem com relação às comunidades de bactérias que abrigam, sendo o ponto P3, o mais rico em número de ribotipos e o ponto P1 o que apresenta o maior percentual (97%) de ribotipos exclusivos,

ou seja, que só foram encontrados nesse ponto. O ponto P1 não compartilhou nenhum ribotipo com o ponto P2, mas compartilhou um ribotipo (174 pb) com o ponto P3. Os pontos P2 e P3 compartilharam seis ribotipos: 55, 115, 419, 427, 539 e 589 pb.

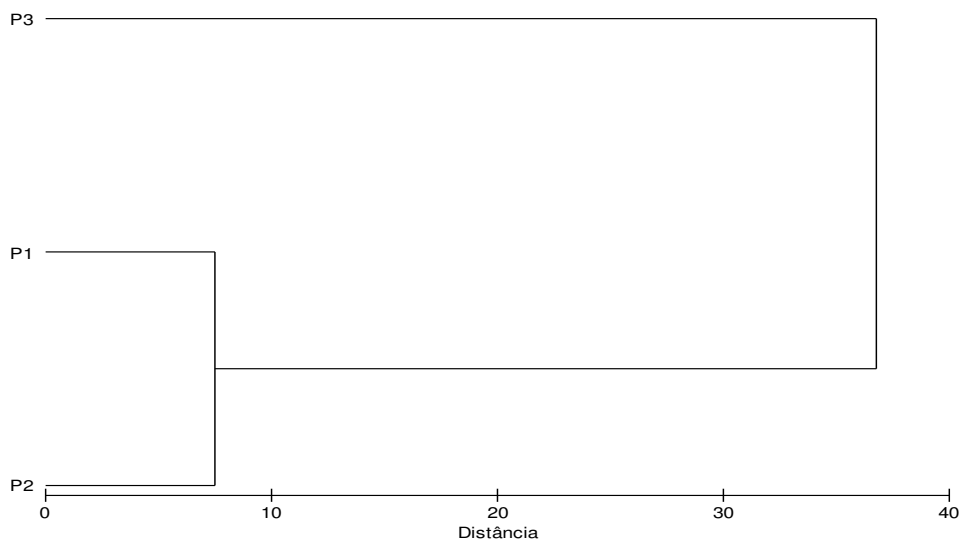


Figura 6. Agrupamento com base na matriz de distância euclidiana para fatores abióticos dos pontos de amostragem P1, P2 e P3 do manguezal da Barra Grande, Icapuí-CE.

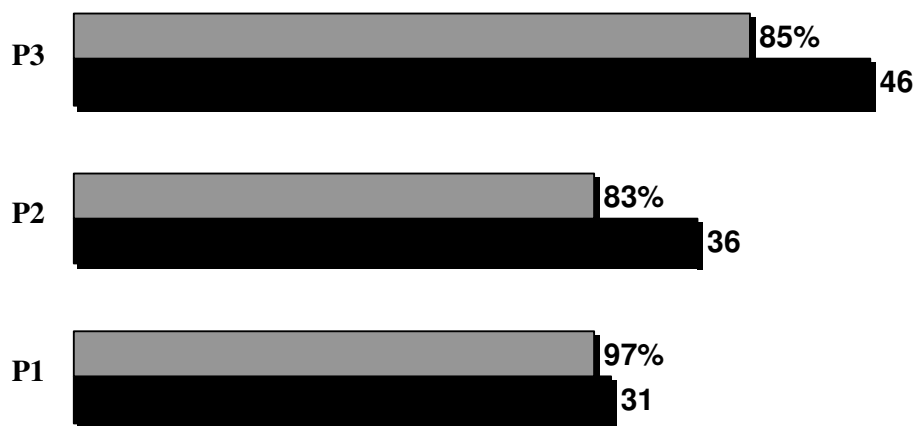


Figura 7. Número total de ribotipos de bactérias de amostras de solos dos pontos P1, P2 e P3 do manguezal da Barra Grande, Icapuí-CE, com os percentuais de ribotipos exclusivos de cada ponto, obtidos a partir da digestão com a enzima de restrição *MspI*. As barras de cor cinza e preta representam o percentual de ribotipos exclusivos e o número total de ribotipos, respectivamente.

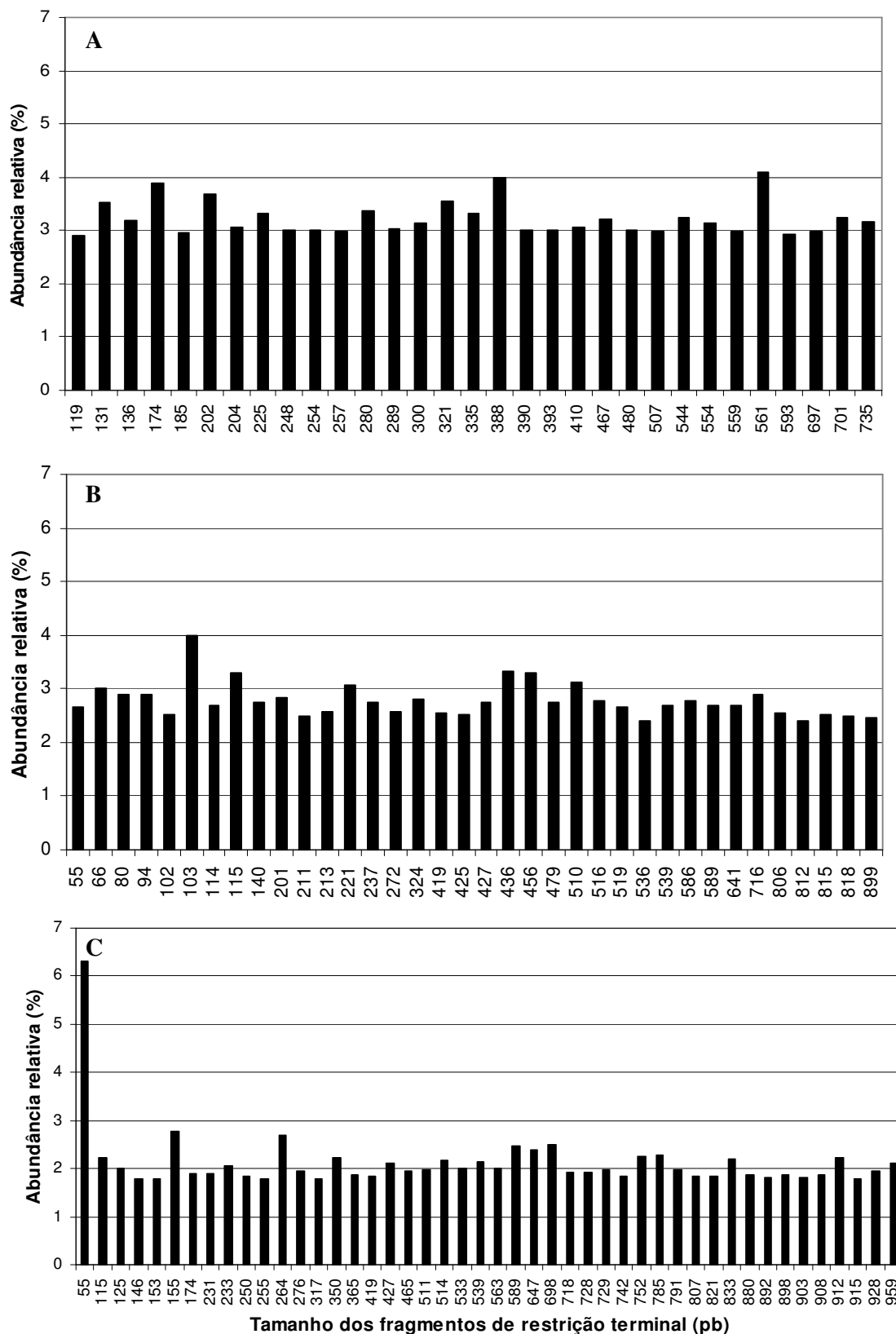


Figura 8. Tamanho dos fragmentos de restrição terminal e suas respectivas abundâncias relativas de amostras de solos do ponto 1 (A), 2 (B) e 3 (C), obtidas da digestão com a enzima de restrição *MspI*.

Já os perfis das comunidades bacterianas de solos dos pontos P1, P2 e P3 do manguezal da Barra Grande obtidos pela digestão com a enzima de restrição *HhaI* estão representados nas figuras 9 e 10. A partir destes dados pode-se reafirmar a presença de comunidades de bactérias diferentes entre os pontos, apresentando os pontos 2 e 3, o mesmo número de ribotipos, enquanto o P1 apresentou o maior percentual (95%) de ribotipos exclusivos. Os três pontos compartilharam um único ribotipo, fragmento de 683 pb. O P1 compartilhou um ribotipo com o P2 e outro com o P3, fragmentos de 629 e 654 pb, respectivamente. Os pontos P2 e P3 compartilharam quatro ribotipos: fragmentos de 128, 347, 427 e 517 pb.



Figura 9. Número total de ribotipos de bactérias de amostras de solos dos pontos P1, P2 e P3 do manguezal da Barra Grande, Icapuí-CE, com os percentuais de ribotipos exclusivos de cada ponto, obtidos a partir da digestão com a enzima de restrição *HhaI*. As barras de cor cinza e preta representam o percentual de ribotipos exclusivos e o número total de ribotipos, respectivamente.

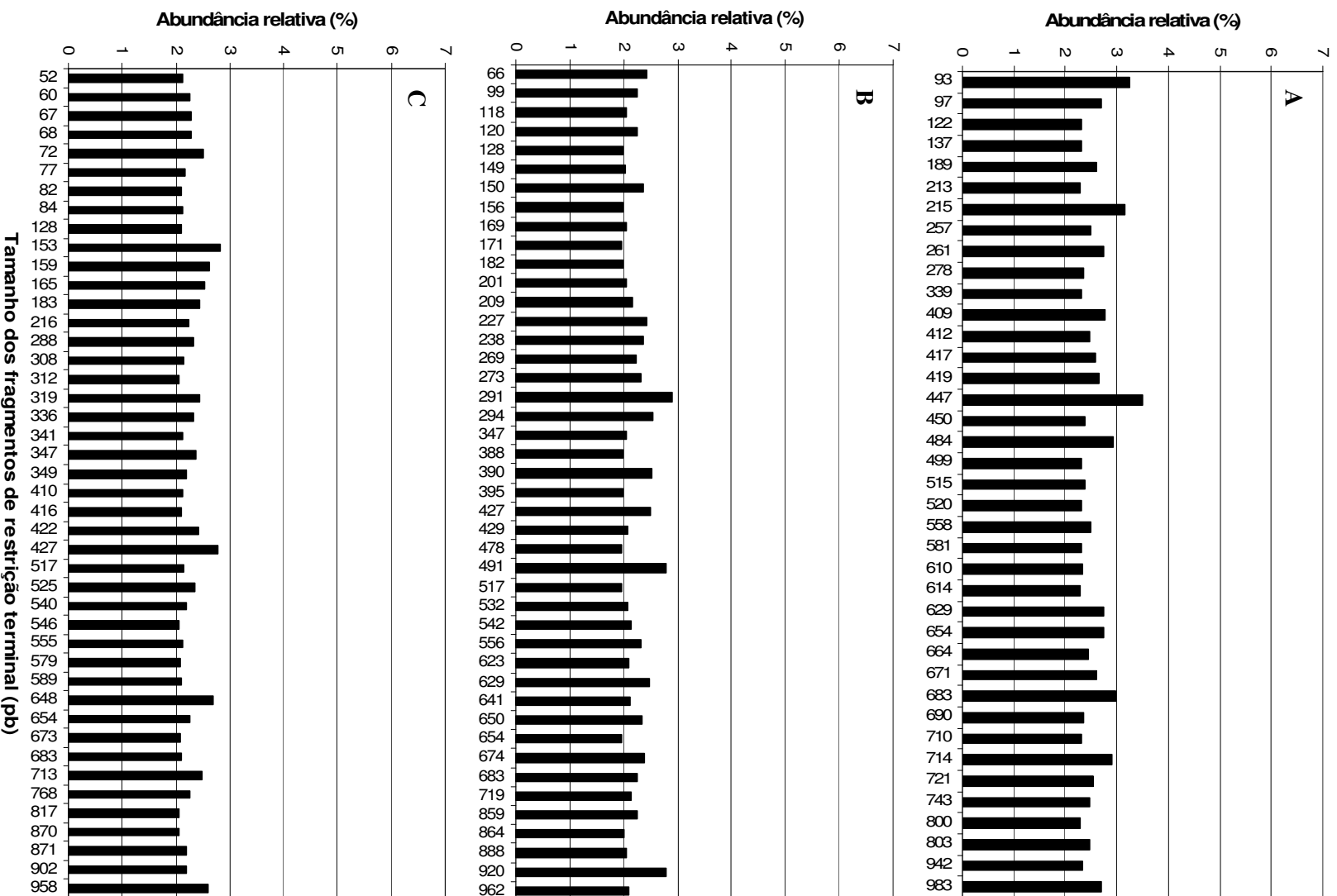


Figura 10. Tamanho dos fragmentos de restrição terminal e suas respectivas abundâncias relativas de amostras de solos do ponto 1 (A), 2 (B) e 3 (C), obtidas da digestão com a enzima de restrição *HhaI*.

Levando-se em consideração os ribotipos bacterianos e suas abundâncias relativas obtidas com as enzimas de restrição *MspI* e *HhaI* foram construídos dendrogramas (figura 11 e 12, respectivamente) para agrupar as amostras de solos dos três pontos estudados com base em suas semelhanças. Os resultados da análise mostraram que os ribotipos encontrados nos solos de cada ponto são diferentes, já que os valores de similaridade foram muito baixos, havendo uma pequena tendência ao agrupamento dos pontos 2 e 3.

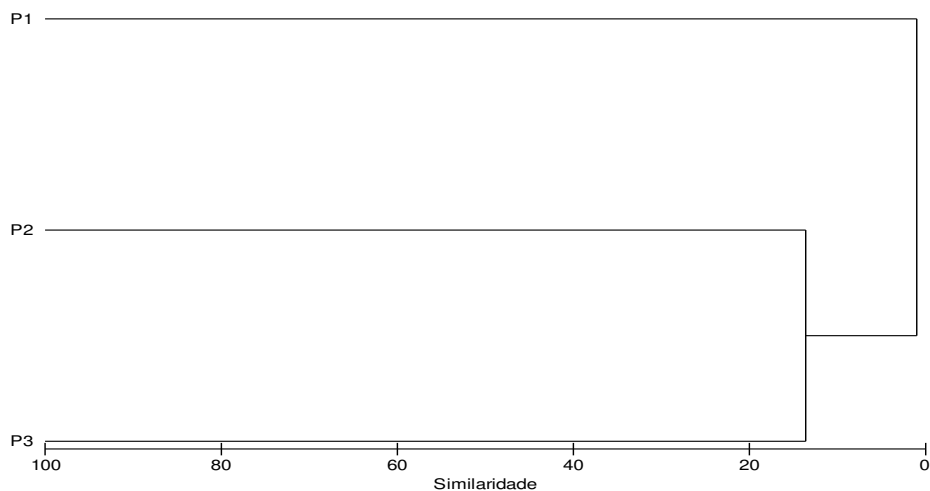


Figura 11. Agrupamento com base na matriz de similaridade de Bray-Curtis para o número e abundância de ribotipos das comunidades de bactérias dos solos obtidos da digestão com a enzima *MspI* dos pontos P1, P2 e P3 do manguezal da Barra Grande, Icapuí-CE.

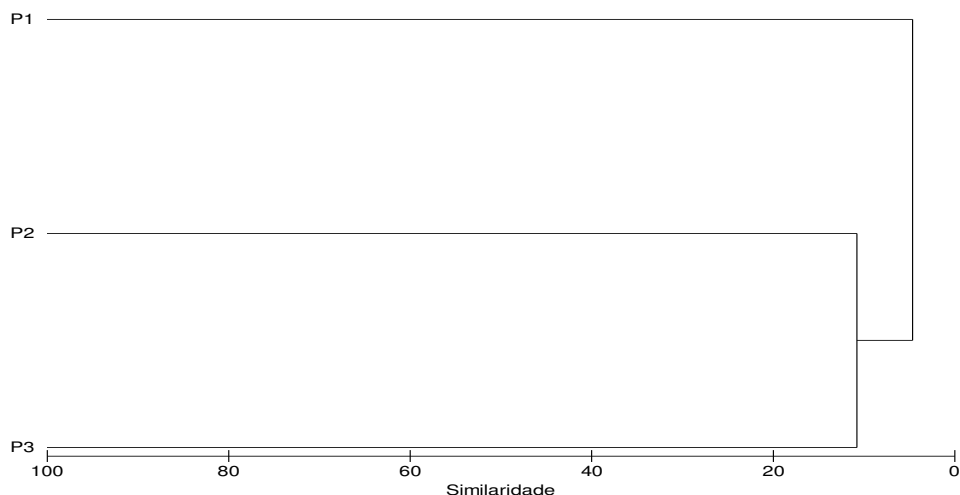


Figura 12. Agrupamento com base na matriz de similaridade de Bray-Curtis para o número e abundância de ribotipos das comunidades de bactérias dos solos obtidos da digestão com a enzima *HhaI* dos pontos P1, P2 e P3 do manguezal da Barra Grande, Icapuí-CE.

A diversidade de ribotipos das amostras de solos obtidas a partir da digestão pelas enzimas de restrição *MspI* e *HhaI* foi analisada por índices ecológicos (tabela 8). Os índices apontaram similaridades em termos de riqueza, equitabilidade e diversidade entre as comunidades de bactérias dos três pontos analisados.

Tabela 8. Índices de diversidade para as comunidades de bactérias de amostras de solos do manguezal da Barra Grande, Icapuí, CE.

Amostras	S	d	J'	H'	λ	
Digestão com <i>MspI</i>	P1	31	6,515	0,9987	4,948	0,03256
	P2	36	7,600	0,9983	5,161	0,02814
	P3	46	9,818	0,9910	5,474	0,02388
Digestão com <i>HhaI</i>	P1	39	8,251	0,9983	5,277	0,02597
	P2	43	9,387	0,9985	5,451	0,02299
	P3	43	9,337	0,9990	5,454	0,02291

S: número de ribotipos; d: riqueza de Margalef; J':equitabilidade de Pielou;
H': diversidade de Shannon e λ : diversidade de Simpson.

5.3. Isolamento e seleção de bactérias de solo degradadoras de petróleo e derivados

A figura 13 mostra as culturas de enriquecimento após quatro dias de incubação em meio mineral contendo petróleo. A partir do procedimento de enriquecimento em petróleo foram obtidos 18 isolados distintos de bactérias.



Figura 13. Frascos contendo meio mineral com petróleo e sedimentos dos pontos 1, 2 e 3, respectivamente, após quatro dias de incubação (1º enriquecimento).

Esses isolados foram testados quanto à capacidade de degradar n-Hexadecano. A partir das curvas de crescimento em 1% desse hidrocarboneto, representadas na figura 14, podem-se observar três grupos distintos. Um grupo de eficientes degradadores, formado pelos isolados IC6, IC17, IC18 e IC20; um grupo de degradadores moderados, compreendendo os isolados IC10, IC12, IC14 e IC16 e um terceiro grupo com 10 isolados que não foram capazes de metabolizar 1% de n-Hexadecano. Vale ressaltar que as cepas que mostraram melhor desempenho foram isoladas do ponto P3 do manguezal, com exceção da IC17 que foi isolada do ponto P2.

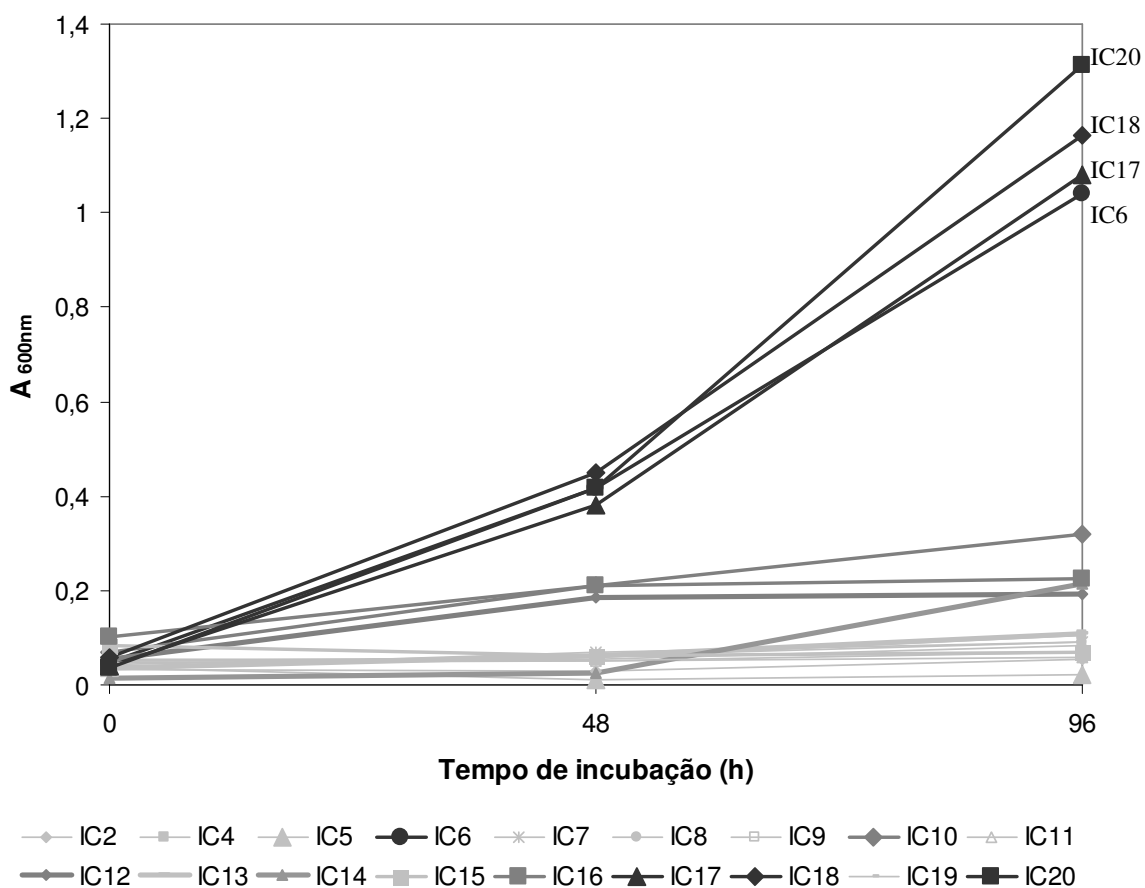


Figura 14. Crescimento de linhagens bacterianas isoladas do manguezal da Barra Grande, Icapuí-CE, em meio mineral contendo 1% (v/v) de n-Hexadecano como única fonte de carbono.

O aspecto das células e colônias dos isolados bons degradadores cultivados em meio mineral com 1% de n-Hexadecano está representado na figura 15.

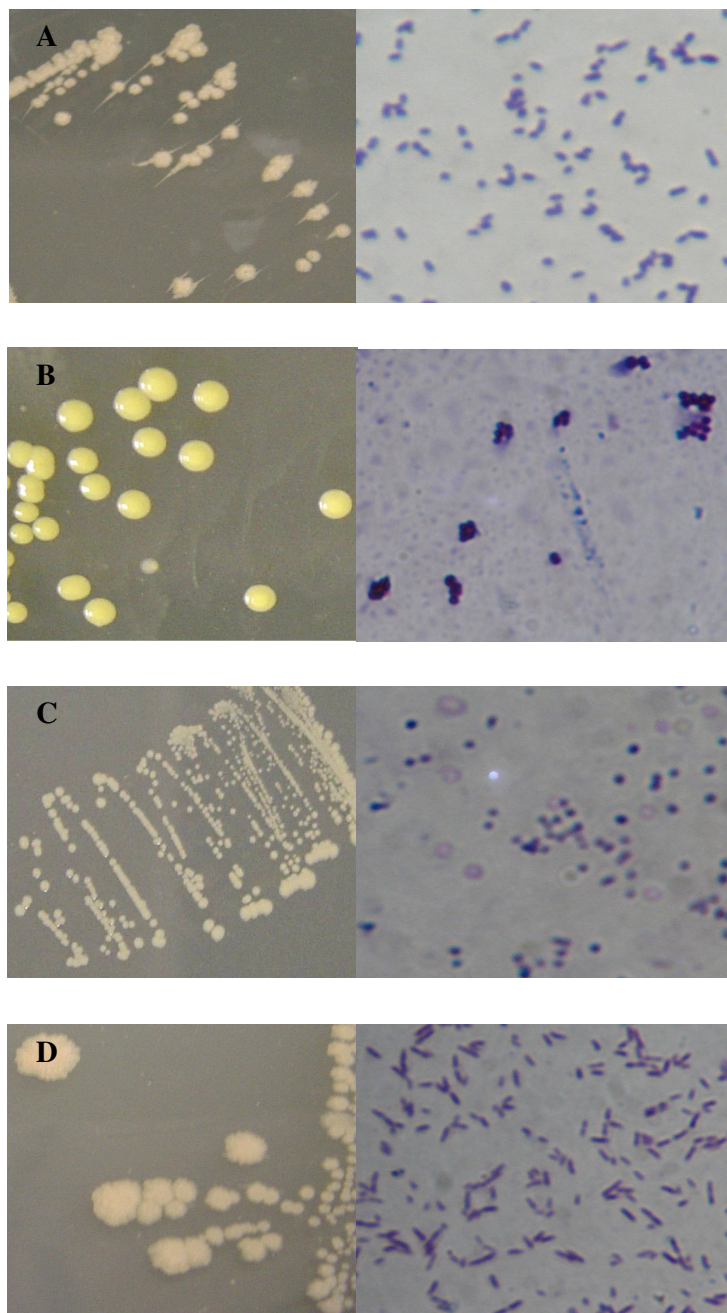


Figura 15. Aspecto das colônias (esquerda) e células (direita) de linhagens de bactérias isoladas de solos do manguezal da Barra Grande, Icapuí-CE. Isolado IC6 (A), IC17 (B), IC18 (C) e IC20 (D) cultivados em PCA com 2 % NaCl por 48 horas a 32°C. As lâminas foram coradas por coloração de Gram e fotografadas em microscópio óptico com aumento de 1000 x.

5.4. Biodegradação de n-Hexadecano por bactérias selecionadas

A capacidade dos isolados IC6, IC17, IC18 e IC20 para utilizar n-Hexadecano na concentração de 10% (v/v) está mostrada na figura 16. O isolado IC18 destacou-se em relação aos demais, apresentando crescimento significativo ($p < 0,001$) em comparação aos outros isolados, que não cresceram nessa concentração de substrato. A partir desse resultado, o isolado IC18 foi selecionado para os testes subsequentes de biodegradação de n-Hexadecano.

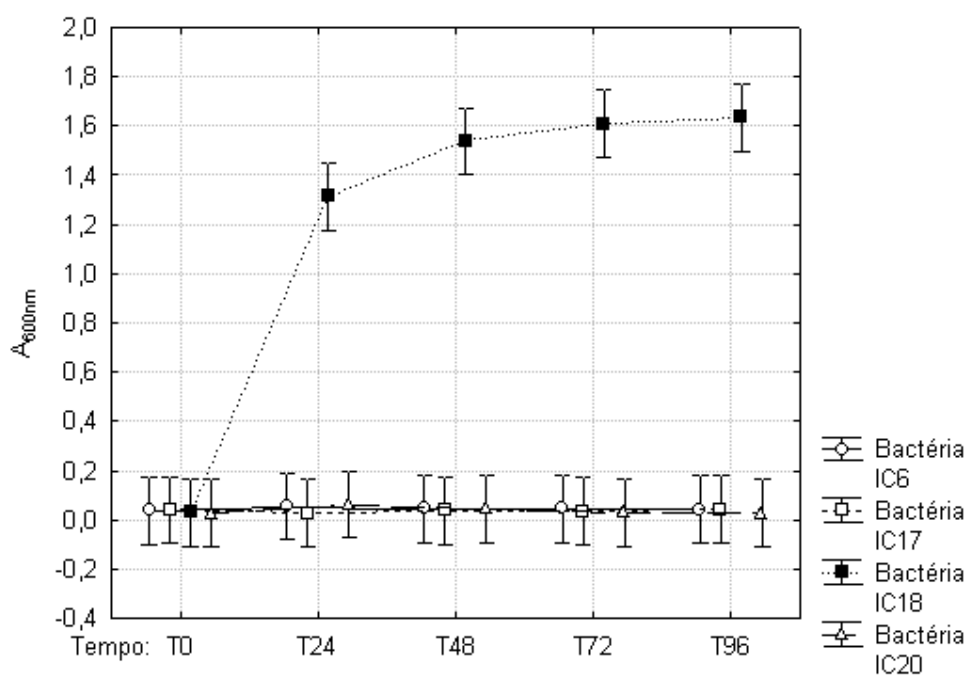


Figura 16. Curvas de crescimento dos isolados IC6, IC17, IC18 e IC20 na presença de 10% de n-Hexadecano.

As curvas de crescimento de IC18 em diferentes concentrações de n-Hexadecano estão representadas na figura 17. As curvas mostraram perfis semelhantes (figura 17), tendo sido detectado, entretanto, diferença significativa relativa à concentração de substrato utilizado ($p = 0,04554$), que deve estar relacionada com o crescimento inicial mais rápido na concentração de 20% de n-Hexadecano. Além disso, o crescimento da bactéria no decorrer do tempo foi extremamente significativo ($p < 0,0001$). A fase lag durou em torno de 6-9 horas, na dependência da concentração do substrato, seguida de um aumento do crescimento que atingiu o seu máximo com 48 horas. A partir desse tempo, as culturas entraram em fase

estacionária. Além disso, a biodegradação foi acompanhada pelo abaixamento do pH do meio que passou de pH 7,5 para 5,0 nas primeiras 9 horas de incubação nas concentrações de 10, 15 e 20% e com 24 horas de incubação na concentração de 1% de n-Hexadecano.

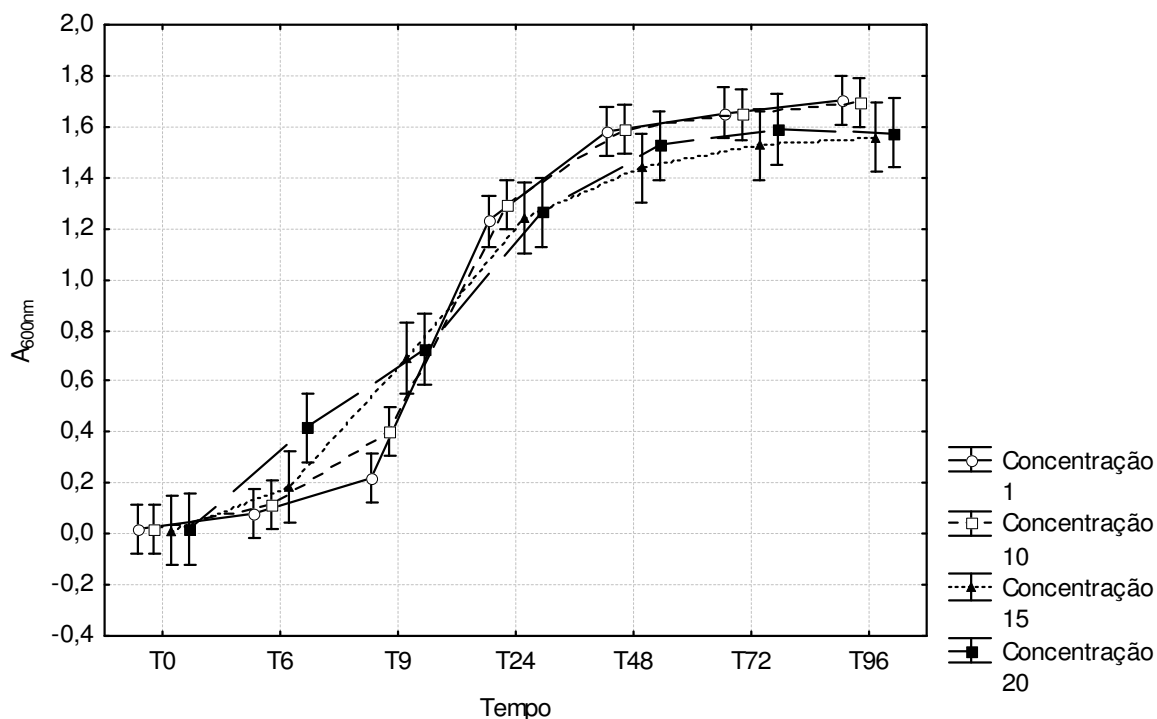


Figura 17. Curvas de crescimento de IC18 em diferentes concentrações de n-Hexadecano, 1, 10, 15 e 20%.

As cromatografias gasosas mostraram que o isolado IC18 foi capaz de degradar 95% de uma concentração inicial de 1% (v/v) de n-Hexadecano em 48 horas. Na concentração de 10% (v/v) do hidrocarboneto, esse isolado degradou em torno de 40% do total. Já em concentrações mais altas, 15 e 20% (v/v) de n-Hexadecano, foram detectadas degradações de 30% da concentração inicial. A biodegradação não foi acompanhada da produção de emulsificantes, como comprovado pelo teste negativo de emulsificação de querosene.

5.5. Identificação molecular da bactéria selecionada

O isolado selecionado na etapa anterior foi submetido à identificação molecular através do sequenciamento da região do rRNA 16S. A cepa IC18 apresentou 99% de

similaridade com *Acinetobacter* sp. linhagem J42, depositada no GenBank com código de acesso EU143354.1 (Apêndice I).

5.6. Hidrofobicidade celular da cepa *Acinetobacter* sp. IC18

O resultado do ensaio de hidrofobicidade celular realizado com o isolado IC18, representado na figura 18, mostrou que a superfície celular desta bactéria apresenta uma alta hidrofobicidade, em torno de 90%, o que pode ser observado a partir do contato com volume de 0,3 mL de n-Hexadecano (aproximadamente 9% v/v).

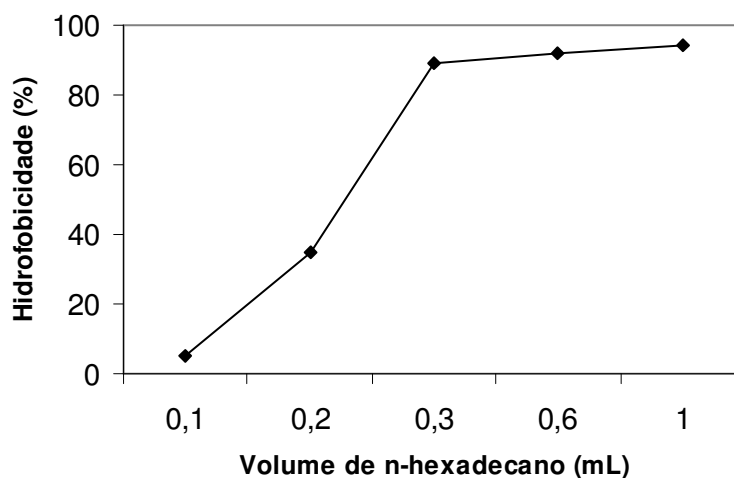


Figura 18. Percentual de hidrofobicidade da cepa *Acinetobacter* sp. IC18.

5.7. Avaliação da susceptibilidade de *Acinetobacter* sp. IC18 a antibióticos e a radiação ultravioleta

A tabela 9 apresenta a susceptibilidade da cepa *Acinetobacter* sp. IC18 a diferentes antibióticos. Essa bactéria foi sensível à metade dos antibióticos testados e apresentou uma sensibilidade intermediária a dois deles, sendo resistente à penicilina G e cloranfenicol. Em relação ao efeito da radiação ultravioleta, esta cepa foi capaz de sobreviver a um tempo de exposição máxima de 7 minutos.

Tabela 9. Susceptibilidade da cepa *Acinetobacter* sp. IC18 a diferentes antibióticos.

Antibiótico	Concentração (µg)	Classificação
ciprofloxacina	5	sensível
cloranfenicol	30	resistente
eritromicina	15	intermediário
estreptomicina	10	sensível
penicilina G	10	resistente
rifampicina	5	intermediário
sulfazotrim	25	sensível
tetraciclina	30	sensível

Classificação baseada em medidas de referências aprovadas pela Sociedade Brasileira de Microbiologia (2005).

6. DISCUSSÃO

As medidas de variáveis ambientais e propriedades dos solos do manguezal da Barra Grande obtidas no presente trabalho mostraram que o ponto P3 possui valores mais altos de matéria orgânica, percentual silte e argila e temperatura, além de pH e salinidade mais baixos. No entanto, os três pontos não apresentaram diferenças marcantes nesses fatores abióticos, como foi confirmado pela análise de agrupamento, que mostrou distâncias em torno de 35 entre os três pontos, além de uma menor distância entre P1 e P2.

Em relação à salinidade da água intersticial foram obtidos valores entre 53,75 e 46, sendo a maior salinidade observada no ponto P1, que está sob maior influência das marés. Esses valores estão próximos aos encontrados em outros manguezais do Brasil, como os manguezais do estuário do rio São Mateus no Espírito Santo (BERNINI *et al.*, 2006), Jaguaribe (Itamaracá) em Pernambuco (SILVA-FALCÃO; SEVERI; ROCHA, 2007), Pacoti e Pirangi no Ceará (SILVA, 2006), onde os maiores valores de salinidade registrados foram em torno de 40, 47, 40 e 40,5, respectivamente. No entanto, deve-se considerar o fato de que o manguezal da Barra Grande tem uma menor influência da entrada de água doce, já que não apresenta a contribuição de um rio, o que poderia explicar a salinidade mais alta do ponto P1.

O pH da água de percolação do solo observado no presente trabalho apresentou uma variação de 8,8 a 10,45, sendo o menor valor detectado no ponto P3, o que está de acordo com a localização dos pontos de maneira perpendicular à linha da costa, pois esse ponto está mais distante da influência das marés. Valores de pH variando de levemente ácido a alcalino foram observados por Bernini *et al.* (2006) em águas intersticiais de solos de manguezais do sudeste brasileiro e Chaerun *et al.* (2004) em amostra de água do mar de áreas costeiras. Já a temperatura registrada na água de percolação dos solos do manguezal da Barra Grande, de maneira similar ao encontrado tipicamente em outros manguezais de regiões tropicais (SILVA, 2006; SILVA-FALCÃO; SEVERI; ROCHA, 2007), apresentou uma pequena variação de 31 a 34,6°C.

Segundo Bernini *et al.* (2006) a matéria orgânica do solo de manguezal é um fator ambiental extremamente variável, sujeito ao regime das marés e à produção de serapilheira. Os teores de matéria orgânica dos solos do manguezal em estudo variaram de 2,36 a 8,36 %, sendo a maior concentração encontrada no ponto P3, que se localiza em uma região mais próxima ao continente, com presença de vegetação de mangue mais desenvolvida e baixo hidrodinamismo, o que favorece o maior acúmulo de matéria orgânica.

Aguiar Neto *et al.* (2007), estudando a concentração de matéria orgânica em solos de áreas de manguezal em Icapuí no mês de setembro de 2005, relataram que os teores de matéria orgânica na camada superficial do solo variaram de 0,35 a 0,70 %. Esses valores foram inferiores aos obtidos no presente estudo, no entanto, devem-se levar em consideração as diferenças de metodologia, período e localização dos pontos amostrados, pois essa característica do solo é bastante variável.

Vários trabalhos em regiões de manguezal mostram essa ampla variação dos teores de matéria orgânica de 0,48 a 2,34 % em solos do manguezal do Espírito Santo (BERNINI *et al.*, 2006), de 2,29 a 6,87 % e 3,42 a 7,65 % nos manguezais de Pacoti e Pirangi no Ceará, respectivamente (SILVA, 2006). Dessa forma, o manguezal da Barra Grande apresentou valores dentro da média encontrada em manguezais brasileiros.

Os manguezais, em geral, são ambientes de baixa energia com predomínio de acúmulo de frações finas, no entanto, sua granulometria é influenciada pela hidrodinâmica local. No presente trabalho, foram encontrados solos com percentual de silte e argila de 7,16 a 32,74 %, com as maiores concentrações observadas no ponto P3. A vegetação de mangue mais desenvolvida nesse ponto, com suas raízes pronunciadas e de penetração profunda, reduzem as correntes das marés e contribuem na retenção de grãos mais finos, além de ficar em uma região mais distante da influência direta das marés.

Gomes *et al.* (2002), estudando um ponto no manguezal de Itamaracá em Pernambuco durante o período de um ano, observou modificações na concentração de grãos finos (silte e argila) de 13,55 a 63,99%, o que reforça a afirmação da inconstância dessa característica do solo.

As amplas flutuações de variáveis ambientais presentes em áreas de manguezal exercem estresse seletivo sobre os microrganismos e conseqüentemente determinam sua diversidade e distribuição. Assim, os microrganismos que colonizam os solos de regiões de manguezal devem estar eficientemente adaptados às mudanças bruscas que ocorrem naturalmente no ambiente. Além disso, segundo Molnar *et al.* (2002), as propriedades do solo, como textura e teor de matéria orgânica exercem influência na comunidade microbiana e também nos processos de biodegradação no solo.

Estudos recentes em ecologia microbiana geram a possibilidade de combinar técnicas dependentes de cultivo e moleculares para descrever a diversidade bacteriana em ambientes tão complexos quanto os solos (TORSVIK; OVREAS, 2002; BRITO *et al.*, 2006).

Uma das técnicas que vem sendo bastante utilizada para estudar comunidades microbianas de solos é o T-RFLP (Polimorfismo no Tamanho de Fragmentos de Restrição

Terminal). Vários estudos têm utilizado o T-RFLP para analisar a estrutura e dinâmica de comunidades microbianas em solos contaminados, sedimentos de aquíferos, microcosmos de solos, efluentes, reatores e culturas de enriquecimento (LIU *et al.*, 1997; MARSH, 1999; OSBORN; MOORE; TIMMIS, 2000; DUNBAR; TICKNOR; KUSKE, 2000; 2001; WATTS *et al.*, 2001; GRANT *et al.*, 2007; MUCKIAN *et al.*, 2007).

Segundo Liu *et al.* (1997) essa técnica molecular é uma ferramenta poderosa, sensível e reproduzível, capaz de gerar informações sobre a diversidade de comunidades microbianas complexas, o que permite observar mudanças na estrutura das comunidades em resposta a pressões seletivas e perturbações ao sistema, como poluição, efeito da adição de nutrientes, predação, mudanças climáticas.

Atualmente, poucos trabalhos foram realizados no Brasil sobre a diversidade bacteriana de solos de manguezal utilizando T-RFLP. Dessa forma, o presente trabalho apresenta um conhecimento pioneiro da microbiota bacteriana de solos do manguezal Barra Grande, Icapuí-CE, revelando os perfis das comunidades bacterianas de amostras de solos de três pontos distintos desse manguezal através da técnica de T-RFLP.

Nas amostras de solos dos pontos P1, P2 e P3, foram detectados 31, 36 e 46 ribotipos ou OTUs, respectivamente, utilizando a enzima de restrição *MspI* e 39, 43 e 43 ribotipos, considerando os fragmentos terminais obtidos da digestão com a enzima *HhaI*. Dessa forma, pode-se observar que não houve grande diferença entre o número de ribotipos encontrados nos três pontos ao longo do manguezal, o que mostra que as comunidades bacterianas dos solos desse ambiente apresentam um padrão de riqueza uniforme.

Brito *et al.* (2006) utilizando essa mesma técnica molecular para analisar a comunidade bacteriana de mesocosmos *in situ* de solos do manguezal de Guapimirim, localizado na Baía de Guanabara (RJ), contaminado artificialmente com petróleo, encontraram entre 27 e 68 TRFs. Assim, apesar de terem utilizado enzimas de restrição diferentes, *HaeIII* ou *Himp II*, o número de fragmentos terminais obtidos foi semelhante ao presente trabalho.

Em relação ao percentual de TRFs exclusivos, pode-se perceber que apesar de uma semelhança em número total de ribotipos, os solos do manguezal em estudo abrigam comunidades bacterianas bastante distintas, confirmada pelos altos valores de exclusividade que variaram de 83 a 97 % e pelo baixo índice de similaridade observado entre as amostras de solo, considerando as comunidades bacterianas dos três pontos. Assim, esses dados mostram que pequenas diferenças em fatores abióticos, decorrentes da própria localização dos pontos

de maneira perpendicular à linha de costa e com distância de 150 m entre eles, podem ser capazes de diferenciar as populações bacterianas.

Estudos recentes sobre a biogeografia das comunidades bacterianas têm mostrado que fatores ambientais como salinidade e pH são extremamente importantes na determinação da distribuição das comunidades microbianas em escala continental.

Lozupone e Knight (2007), através de análises estatísticas baseadas em dados de seqüências do gene que codifica o rRNA compiladas de 11 estudos de diversos ambientes, desde solos, água do mar, sedimentos e locais com extremos de temperatura, pH, salinidade e disponibilidade de nutrientes, encontraram que a salinidade é o principal fator ambiental determinante da composição da comunidade microbiana. Fierer e Jackson (2006) estudando as comunidades bacterianas de solos através de perfis moleculares gerados por T-RFLP de 98 amostras de solos da América do Norte e do Sul, propuseram que o pH do solo é um fator ambiental mais importante do que a distância geográfica para influenciar a estrutura de comunidades microbianas.

Entretanto, segundo Buckley e Schmidt (2002), considerando a diversidade em escala local, outros parâmetros como tipo de vegetação, temperatura, salinidade, disponibilidade de carbono e nutrientes, pH, textura e umidade do solo podem ser considerados como determinantes da composição microbiana.

A riqueza e a abundância são conceitos que definem a estrutura e diversidade das comunidades. Essas duas variáveis refletem pressões seletivas que modelam a diversidade dentro das comunidades e podem também indicar a habilidade de uma comunidade bacteriana para recuperar-se de distúrbios e utilizar recursos eficientemente (DUNBAR; TICKNOR; KUSKE, 2000). Muitos índices de diversidade buscam refletir não só um, mas ambos os conceitos. Dentre os índices mais utilizados para cálculos e comparação de riqueza estão: índice de riqueza de espécies de Margalef; índice de diversidade de Shannon-Weaver; índice de diversidade de Simpson e equitabilidade de Pielou (MAGURRAN, 2004).

Kennedy e Smith (1995) consideraram que os índices, embora não representem a composição total de uma comunidade, permitem dimensionar a riqueza, a igualdade e a diversidade em diferentes ambientes.

A determinação da riqueza de Margalef reflete diretamente a quantidade de ribotipos obtidos nas amostras de solo dos três pontos do manguezal da Barra Grande. Dessa forma, os valores de riqueza observados foram semelhantes em todas as amostras, o qual confirma que a diferença em quantidade de ribotipos nos solos dos três pontos do manguezal não foi significativa.

A partir do índice de equitabilidade de Pielou, pode-se perceber que as comunidades de bactérias nos três pontos são bastante homogêneas, isto é, todas mostram uma grande diversidade, sem predomínio de ribotipos dominantes, refletindo um estágio de equilíbrio dessa comunidade bacteriana. O índice de diversidade de Simpson reforça o que foi observado anteriormente, pois seus valores sugerem uma baixa dominância de fragmentos. Além disso, o índice de diversidade de Shannon, que é baseado na riqueza e dominância apresentou valores semelhantes entre todas as amostras.

De maneira similar ao presente estudo, Zhou *et al.* (2002) trabalhando com solos de quatro regiões geograficamente distintas, observaram que as comunidades microbianas de solos com alta concentração de carbono ou solos superficiais com pequena concentração desse elemento apresentam um padrão de diversidade uniforme, pois não possuem nenhum ribotipo dominante. Esses autores explicaram tal comportamento não-competitivo como consequência de quatro possíveis mecanismos, que são a abundância ou heterogeneidade de recursos, o isolamento espacial e as condições ambientais flutuantes. Dessa forma, no manguezal da Barra Grande pode-se considerar esse último mecanismo como um dos principais responsáveis pelo padrão não-competitivo das comunidades bacterianas.

Segundo Dunbar, Ticknor e Kuske (2000), apesar de todas as inferências que podem ser feitas acerca da diversidade das comunidades bacterianas, é importante ter cautela na interpretação da diversidade a partir de dados de fragmentos terminais obtidos por T-RFLP, pois enquanto um tamanho de um fragmento pode derivar unicamente de um pequeno e filogeneticamente grupo de bactérias, outro fragmento pode representar um grupo mais amplo de organismos relacionados. Assim, a diversidade pode ser subestimada.

No presente trabalho os dados gerados pela técnica de T-RFLP foram capazes de mostrar diferenças entre as comunidades bacterianas ao longo do manguezal, permitir a observação de um padrão na diversidade dessas comunidades e estimar uma diversidade mínima, já que cada fragmento de restrição terminal obtido corresponde a OTU.

Considerando essa grande diversidade bacteriana presente nos solos do manguezal da Barra Grande, foram obtidos dezoito isolados bacterianos, utilizando técnicas de enriquecimento com petróleo oriundo de poços da fazenda Belém. Assim, apesar de não ter um histórico de contaminação crônica ou aguda, o solo do manguezal da Barra Grande abriga populações de bactérias que quando em contato com petróleo são capazes de sobreviver e utilizar tais compostos como fonte de carbono e energia, confirmando o potencial de microrganismos de regiões não contaminadas para degradar hidrocarbonetos do petróleo (ATLAS, 1981; IJAH, 1998; TAM *et al.*, 2002; PINI *et al.*, 2007). Além disso, reforça a idéia

de que a comunidade bacteriana indígena de solos de manguezal tem um considerável potencial para degradar hidrocarbonetos (RAMSAY *et al.*, 2000; DÍAZ *et al.*, 2000; TAM *et al.*, 2002; GUO *et al.*, 2005; YU *et al.*, 2005; BRITO *et al.*, 2006).

Alguns trabalhos mostraram que não existe uma correlação significativa entre as concentrações de hidrocarbonetos em solos de manguezal e a habilidade de degradação destes compostos pelos microrganismos nativos. Na realidade, as propriedades físico-químicas dos solos de cada manguezal e a estrutura da comunidade microbiana indígena, em particular os tipos e quantidades de microrganismos é que são determinantes para a capacidade de degradação de hidrocarbonetos (GUO *et al.*, 2005; TAM *et al.*, 2002).

Neste trabalho, os isolados que apresentaram o maior potencial para degradar n-Hexadecano foram principalmente provenientes do ponto P3, região de vegetação mais densa e rica em matéria orgânica do manguezal. Dessa forma, pode-se sugerir que as bactérias dessa região estão mais adaptadas à degradação de hidrocarbonetos em virtude da própria característica de acumulação de poluentes em solos mais lamosos e com mais altos teores de matéria orgânica. Chaerun *et al.* (2004) avaliaram o processo de biorremediação em microcosmos contendo água do mar, óleo pesado e areia de praia, através do acompanhamento durante cinco anos da concentração de carbono e a atividade de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos, tendo sido observada uma forte correlação positiva entre a quantidade de matéria orgânica e abundância de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos.

Estudos prévios em manguezais têm determinado que a degradação de hidrocarbonetos é mediada por uma ampla variedade de gêneros bacterianos (RAMSAY *et al.*, 2000; TAM *et al.*, 2002; GUO *et al.*, 2005; YU *et al.*, 2005; BRITO *et al.*, 2006). Dentre as dezoito cepas isoladas do manguezal da Barra Grande, quatro foram selecionadas como degradadoras de n-Hexadecano. Um dos isolados, que apresentou o melhor desempenho na degradação de altas concentrações de n-Hexadecano, foi identificado como pertencente ao gênero *Acinetobacter*. Os membros desse gênero são conhecidos como bons degradadores de hidrocarbonetos, inclusive alcanos (ROSENBERG *et al.*, 1982; NOORDMAN *et al.*, 2002; YU *et al.*, 2005; THRONE-HOLST, *et al.*, 2006; WENTZEL *et al.*, 2007).

É interessante enfatizar que embora tenham sido selecionados apenas quatro isolados como bons degradadores de n-Hexadecano não se pode descartar a hipótese de que os demais tenham potencial para degradar outros tipos de hidrocarbonetos. Venkateswaram e Harayama (1995 apud MARIANO, 2006) usando culturas de enriquecimento isolaram populações capazes de degradar petróleo bruto. Entre as espécies obtidas estavam

Acinetobacter sp., *Pseudomonas vesicularis*, *Pseudomonas diminuta*, *Moraxella* sp., *Sphingobacterium* sp. e *Ochrobactrum* sp.

Bactérias do gênero *Acinetobacter* estão amplamente distribuídas no ambiente, podendo ser encontradas na água, solo e organismos vivos. Estas bactérias são estritamente aeróbias e se apresentam preferencialmente como diplococos ou bacilos curtos. Os membros desse grupo são quimioheterotróficos versáteis, que têm a habilidade de crescer em uma ampla variedade de compostos orgânicos como fonte de carbono. Essas propriedades nutricionais e a ocorrência ubíqua no ambiente sugerem que esses microrganismos devem ser agentes importantes na mineralização da matéria orgânica na natureza. Dessa forma, espécies de *Acinetobacter* tem sido alvo de crescente interesse em aplicações biotecnológicas e ambientais (BAUMANN, 1968; ABDEL-EL-HALEEM, 2003; BARBE *et al.*, 2004).

O isolado identificado como *Acinetobacter* sp. IC18 apresentou o maior potencial para degradação de n-Hexadecano, produzindo altas densidades populacionais durante o tempo de incubação. Esse isolado foi capaz de metabolizar até 30% de uma concentração tão alta quanto 20% de n-Hexadecano em 48 horas. Muitos estudos de biodegradação de n-Hexadecano por microrganismos em sistemas líquidos têm utilizado concentrações de até 15 g/L, referente a 2% v/v (OLIVERA; ESTEVES; COMMENDATORE, 1997; SCKELSKY; SHREVE, 1999; NOORDMAN *et al.*, 2002; CHÉNIER *et al.*, 2003; PEPI *et al.*, 2005), o que ressalta ainda mais o potencial da cepa IC18, já que foi capaz de crescer numa concentração 10 vezes maior.

Costa (2006) também testou a biodegradação de altas concentrações de n-Hexadecano, até 15% (v/v), usando cepas de *Bacillus pumilus* e *Ochrobactrum anthropi*, e verificou que essas cepas de bactérias mostraram melhor desempenho em 1% e 5% de n-Hexadecano. *Bacillus pumilus* foi capaz de degradar cerca de 95% de uma concentração inicial de 1% de n-Hexadecano em um tempo de incubação de 144 horas. Estudos realizados com uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, na presença de surfactantes, revelaram que 60% da concentração inicial de n-Hexadecano (0,9 g/L) foi consumido após 40 horas de incubação (SCKELSKY; SHREVE, 1999). Olivera, Esteves e Commendatore (1997) utilizaram consórcios bacterianos, obtidos de sedimentos contaminados com hidrocarbonetos, que conseguiram degradar cerca de 95% do n-Hexadecano (0,0928 g/L) em um tempo de incubação de 120 horas. Koma *et al.* (2001) realizaram ensaios de biodegradação de n-Parafinas de cadeia longa, por uma cepa de *Acinetobacter* sp. isolada de solo, e mostraram que esta cepa mineralizou 0,1% (p/v) desse composto em 96 horas de incubação. Quando crescendo na presença de n-Hexadecano, esta cepa produziu como subprodutos 1-hexadecanol

e ácido 1-hexadecanóico, indicando que a rota metabólica utilizada para degradação de n-alcanos era via oxidação terminal.

Com base nos exemplos supracitados, é possível afirmar que a cepa *Acinetobacter* sp. IC18 apresentou uma grande capacidade de degradar n-Hexadecano. Essa biodegradação foi acompanhada do abaixamento do pH do meio, que pode estar relacionada à formação de subprodutos ácidos durante a degradação do hidrocarboneto testado, pois em todas as rotas de biodegradação de n-alcanos utilizadas por bactérias existe a formação de ácidos orgânicos, o qual pode ser o responsável pela acidificação do meio de cultura durante esse processo.

Várias rotas de oxidação de alcano têm sido encontradas em espécies de *Acinetobacter*. Dados bioquímicos sugerem que a enzima citocromo P-450 é uma hidroxilase terminal em algumas cepas de *Acinetobacter* que crescem em alcanos de cadeia longa e média. Uma enzima que oxida alcanos com atividade dioxigenase, envolvida na degradação de alcanos de cadeia longa, também tem sido descrita em *Acinetobacter* sp. M-1. Além disso, estudos mostraram que existe uma hidroxilase de alcano terminal dependente de rubredoxina e redutase rubredoxina envolvida na oxidação de alcanos de cadeia longa em *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V e *Acinetobacter* sp. linhagem ADP1. Dessa forma, a degradação de alcano não é uniforme em diferentes cepas de *Acinetobacter*, que apresentam sistemas alternativos de oxidação de alcanos (MAENG *et al.*, 1996; RATAJCZAK; GEIBDÖRFER; HILLEN, 1998). No entanto, no presente trabalho, os subprodutos da biodegradação não foram detectados, o que impossibilita a indicação de que rota metabólica foi utilizada pela cepa *Acinetobacter* sp. IC18 para degradação do n-Hexadecano.

A maioria dos substratos que promovem o crescimento microbiano necessita ser captado ou aderido à célula para tornar-se biodisponível. Várias estratégias são usadas por bactérias para superar a baixa solubilidade de n-alcanos e aumentar seu transporte através da membrana. A natureza hidrofóbica da superfície celular bacteriana desempenha uma função importante, já que o contato da célula com substratos hidrofóbicos é crucial para a etapa inicial de degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos que é mediada por oxigenases associadas à superfície celular. No caso de n-alcanos de cadeia longa, existem dois mecanismos de captura pelas bactérias. O primeiro envolve o acesso interfacial pelo contato direto da célula com o hidrocarboneto, facilitado pela superfície celular hidrofóbica, e o segundo é mediado por biossurfactantes, que são moléculas que emulsificam os hidrocarbonetos, facilitando o contato da célula com esses compostos (KIM, FOGHT, GRAY, 2002; BOUCHEZ-NAITALI *et al.*, 2001; WENTZEL *et al.*, 2007).

Com o intuito de diagnosticar o modo de captação de n-Hexadecano pela cepa

IC18 foi analisada sua hidrofobicidade celular e a capacidade de emulsificação de querosene. A cepa *Acinetobacter* IC18 apresentou uma alta hidrofobicidade, mas não produziu emulsificantes. De maneira similar Bouchez-Naitali *et al.* (2001) mostraram que várias cepas hidrofóbicas não produzem surfactantes. Kim, Foght e Gray (2002) mostraram que ocorre o transporte seletivo e acúmulo de alcanos por *Rhodococcus erythropolis* S+14He, uma cepa altamente hidrofóbica (80%). Assim, a cepa em estudo provavelmente utilizou o n-Hexadecano como fonte de carbono através da captação pelo contato direto da superfície celular e as moléculas do hidrocarboneto, sem a necessidade de liberar substâncias emulsificantes para o meio. Sabe-se, entretanto, que diferentes espécies de *Acinetobacter* são produtoras de emulsificantes incluindo lipopolissacarídeos, surfactantes complexos como o emulsan (*Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1) e a glicoproteína alasan (*Acinetobacter radioresistens* KA-53) (DESAI; BANAT, 1997), o qual não foi possível detectar no ensaio de emulsificação de querosene.

Em *Acinetobacter* sp. RAG-1, as fimbrias são consideradas cruciais para o crescimento desta cepa em n-Hexadecano, sendo responsáveis pela adesão desta cepa às superfícies hidrofóbicas, tornando-os acessíveis à captação e metabolismo celular (ROSENBERG *et al.*, 1982). Estudos prévios mostraram que espécies de *Acinetobacter* formam inclusões intracelulares de hidrocarbonetos quando crescem em n-Hexadecano na ausência de fontes de carbono solúveis, o que sugere que essas estruturas estão relacionadas com a oxidação de hidrocarbonetos e certas enzimas do metabolismo de hidrocarbonetos podem estar associadas com estes sistemas de membranas. Assim, foi proposto que n-alcanos podem ser transportados por um mecanismo de transporte ativo possibilitado via membranas intracitoplasmáticas (SCOTT; FINNERTY, 1976; KIM, FOGHT, GRAY, 2002). No presente trabalho, a cepa *Acinetobacter* IC18 pode ter tais estruturas e mecanismos que facilitaram o transporte do hidrocarboneto, pois apesar de não ter produzido emulsificantes, obteve um ótimo desempenho na utilização de n-Hexadecano como única fonte de carbono e energia, o que reforça a idéia de que a superfície celular hidrofóbica permite a eficiente captação de substâncias hidrofóbicas como os hidrocarbonetos.

Em relação à utilização de *Acinetobacter* sp. IC18 em atividades de biorremediação deve-se levar em consideração a sua sobrevivência em condições ambientais adversas, bem como métodos efetivos de controle. Assim, essa cepa foi avaliada quanto a sua susceptibilidade a diferentes antibióticos e a radiação ultravioleta.

Acinetobacter sp. IC18 apresentou susceptibilidade a seis antibióticos e resistência a apenas dois deles, penicilina G e cloranfenicol. Esse resultado confirma outros dados de

literatura que mostram a resistência de cepas de *Acinetobacter* a esses antimicrobianos (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996). Assim, apesar de algumas espécies desse gênero serem consideradas como patógenos oportunistas, a *Acinetobacter* sp. IC18 pode ser classificada como uma cepa de classe de risco 2, já que pode ser capaz de provocar infecções, mas dispõem-se de medidas terapêuticas e profiláticas eficientes para seu controle.

A mais perigosa radiação solar, a UV-C (100-295 nm), é completamente absorvida pelo ozônio, no entanto, a radiação UV-B (295-320 nm) alcança a superfície da Terra, podendo ser absorvida pelos organismos vivos, principalmente pelo DNA, causando alterações em sua estrutura. As mais frequentes lesões ao DNA são as formações dos dímeros de pirimidina. Diferentes mecanismos de reparo têm evoluído em bactérias, entre estes podem ser citadas a reversão direta do dano pela enzima fotoliase (fotoreativação), remoção do erro pela DNA glicosilase, a incisão do DNA adjacente ao dano por uma endonuclease ou a remoção completa do oligonucleotídeo que contem o dano (AGUIAR *et al.*, 2002; GOOSEN; MOOLENAAR, 2008). Segundo Aguiar *et al.* (2002), a formação de um número suficiente de dímeros impede que haja a duplicação do DNA, impossibilitando a reprodução do microrganismo, além de comprometer a síntese protéica.

No presente trabalho, a cepa *Acinetobacter* IC18 foi capaz de sobreviver a um elevado tempo de exposição direta a radiação ultravioleta (7 minutos), de maneira similar a uma cepa de *Bacillus pumilus*, estudada por Costa (2006), que sobreviveu a um tempo de exposição de 8 minutos. Dessa forma, a cepa em estudo deve possuir um eficiente sistema de reparo de DNA.

Considerando seu habitat, potencial biodegradativo, suscetibilidade a antibióticos e resistência a UV, *Acinetobacter* IC18 destaca-se como uma promissora candidata para aplicações em biorremediação.

7. CONCLUSÕES

Os resultados desse trabalho revelaram que os solos do manguezal da Barra Grande, Icapui-CE, são colonizados por populações de bactérias numericamente semelhantes, mas diferentes em composição. Provavelmente, as características físico-químicas e granulométricas peculiares dos microambientes do manguezal sejam responsáveis por essas diferenças. A partir desses resultados é possível inferir que a atividade petrolífera da região parece não estar afetando as populações bacterianas, já que não se detectou predominância de nenhum ribotipo.

Os solos desse manguezal abrigam espécies com potencial de degradação de componentes do óleo cru, como comprovado pela obtenção de dezoito novos isolados com esse perfil. Pelo conjunto de suas características fenotípicas e genotípicas o isolado *Acinetobacter* sp. IC18 emerge deste trabalho como um novo candidato que pode ser explorado para degradação de hidrocarbonetos em ambientes contaminados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-EL-HALEEM, D. *Acinetobacter*: environmental and biotechnological applications. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 71–74, 2003.

AGUIAR, A. M. S. *et al.* Avaliação do emprego da radiação ultravioleta na desinfecção de águas com turbidez e cor moderadas. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 7, n. 1, p. 37-47, 2002.

AGUIAR NETO, A. B. *et al.* Distribuição geoquímica de metais pesados em sedimentos de manguezais de Icapuí - CE. **Anais do IV Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás**, 2007. Disponível em: http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/4/resumos/4PDPETRO_6_2_0237-1.pdf. Acesso em: 07 de fevereiro de 2008.

ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiology Review**, v. 45, p. 180-209, 1981.

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**, v. 32, p. 155-164, 1998.

BARBE, V. *et al.* Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 19, p. 5766-5779, 2004.

BAUER, A. W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-495, 1966.

BAUMANN, P. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. **Journal of Bacteriology**, v. 96, n. 1, p. 39-42, 1968.

BERGOGNE-BÉRÉZIN, E.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2, p. 148–165, 1996.

BERNINI, E. *et al.* Composição química do sedimento e de folhas das espécies do manguezal do estuário do Rio São Mateus, espírito Santo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 4, p. 689-699, 2006.

BERTHE-CORTI, L.; FETZNER, S. Bacterial metabolism of n-alkanes and ammonia under oxic, suboxic and anoxic conditions. **Acta Biotechnology**, v. 22, p. 299–336, 2002.

BOUCHEZ-NAITALI, M. *et al.* Evidence for interfacial uptake in hexadecane degradation by *Rhodococcus equi*: the importance of cell flocculation. **Microbiology**, v. 147, p. 2537-2543, 2001.

BRITO, E. M. S. *et al.* Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 752-762, 2006.

BUCKLEY, D.; SCHMIDT, T. **Exploring the diversity of soil – A microbial rain forest.** In: STALEY, J.; REYSENBACH, A. Biodiversity of Microbial Life. 552 p. Wiley, New York, p. 183-208, 2002.

BURNS, K. A.; CODI, S. Contrasting impacts of localized versus catastrophic oil spills in mangrove sediments. **Mangroves and Salt Marshes**, v. 2, p. 63-74, 1998.

BURNS, K. A.; CODI, S.; DUKE, N. C. Gladstone, Australia field studies: weathering and degradation of hydrocarbons in oiled mangrove and salt marsh sediments with and without the application of an experimental bioremediation protocol. **Marine Pollution Bulletin**, v. 41, p. 392-402, 2000.

BURNS, K. A. *et al.* Assessing the petroleum hydrocarbon potential of endogenous tropical marine wetland microorganisms: flask experiments. **Mangroves and Salt Marshes**, v. 3, p. 67-83, 1999.

BURNS, K. A.; GARRITY, S. D.; LEVINGS, S. C. How many years until mangrove ecosystems recover from catastrophic oil spills? **Marine Pollution Bulletin**, v. 26, p. 249-257, 1993.

BUSHNELL, C. D.; HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, v. 41, p.653-673, 1941.

CHAERUN, S. K. *et al.* Bioremediation of coastal areas 5 years after the *Nakhodka* oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. **Environment International**, v. 30, p. 911-922, 2004.

CHÉNIER, M. R. *et al.* Impact of seasonal variations and nutrient inputs on nitrogen cycling and degradation of hexadecane by replicated river biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5170–5177, 2003.

CORSEUIL, H. X.; MARINS, M. D. M. Contaminação de águas subterrâneas por derramamento de gasolina: o problema é grave? **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 2, p. 50-54, 1997.

COSTA, S. P. **Biodegradabilidade de n-Hexadecano por bactérias livres e imobilizadas em quitosana**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 100 p., 2006.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DÍAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. **International Microbiology**, v. 7, p. 173-180, 2004.

DÍAZ, M. P. *et al.* Isolation and characterization of novel hydrocarbon-degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. **Marine Biotechnology**, v. 2, p. 522–532, 2000.

DOWTY, R. A. *et al.* Phytoremediation of small-scale oil spills in fresh marsh environments: a mesocosm simulation. **Marine Environmental Research**, v. 52, p. 195-211, 2001.

DUBEY, S. K.; TRIPATHI, A. K.; UPADHYAY, S. N. Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2217-2224, 2006.

DUNBAR, J.; TICKNOR, L. O.; KUSKE, C. R. Assessment of microbial diversity in four Southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 2943-2950, 2000.

_____. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 190-197, 2001.

DUTTA, T. K.; HARAYAMA, S. Fate of crude oil by the combination of photooxidation and biodegradation. **Environmental Science and Technology**, v. 34, p. 1500-1505, 2000.

EGERT, M.; FRIEDRICH, M. W. Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 5, p. 2555-2562, 2003.

FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **PNAS**, v. 31, n. 3, p. 626-631, 2006.

FOLK R. L.; WARD W. C. Brazos River Bay: Study of the significance of grain size parameters. **Journal of Sedimentary Petrology**, v. 27, p. 3-27, 1957.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **The world's mangroves 1980–2005**, Roma, 2007. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1427e/a1427e00.pdf>. Acesso em: 20 novembro de 2007.

FOSTER, G. D.; TWELL, D. **Plant Gene Isolation: Principal and Practice**. John Wiley & Sons, England, 328p., 1996.

GOMES, C. A. A. *et al.* Variação temporal da meiofauna em área de manguezal em Itamaracá – Pernambuco. **Revista Atlântica**, v. 24, n. 2, p. 89-96, 2002.

GOOSEN, N.; MOOLENAAR, G. F. Repair of UV damage in bacteria. **DNA Repair**, v. 7, p. 353–379, 2008.

GRAHAM, D. W. *et al.* Effects of nitrogen and phosphorous supply on hexadecane biodegradation in soil systems. **Water Air Soil Pollution**, v.111, p. 1–18, 1999.

GRANT, R. J. *et al.* Microbial community changes during the bioremediation of creosote-contaminated soil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 293-300, 2007.

GROSSER, R. J.; WARSHAWSKY, D.; VESTAL, J. R. Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo[a]pyrene, and carbazolde in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 3462-3469, 1995.

GUO, C. L. *et al.* Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, p. 1054-1061, 2005.

HEAD, I. M.; JONES, D. M.; RÖLING, W. F. M. Marine microorganisms make a meal of oil. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 173-182, 2006.

HOLGIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediments microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, p. 265-278, 2001.

HUA, Z. *et al.* Effects of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on the biodegradation of petroleum compounds. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 25-29, 2004.

IJAH, U. J. J. Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil. **Waste Management**, v. 18, p. 293-299, 1998.

IQBAL, S.; KHALID, Z.M.; MALIK, K.A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters Applied Microbiology**, v. 21, p. 176-179, 1995.

IWAMOTO, T.; NASU, M. Review: current bioremediation practice and perspective. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, p. 1-8, 2001.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B. L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. **Advances in Marine Biology**, v. 40, p. 81-251, 2001.

KE, L. *et al.* Fate of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination in a mangrove swamp in Hong Kong following an oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, p. 339-347, 2002.

KE, L. *et al.* Spatial and vertical distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments. **Science of the Total Environment**, v. 340, p. 177-187, 2005.

KENNEDY, A. C.; SMITH, K. L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and Soil**, v.170, p.75-86, 1995.

KIM, I. S.; FOGHT, J. M.; GRAY, M. R. Selective transport and accumulation of alkanes by *Rhodococcus erythropolis* S+14He. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 80, n. 6, p. 650-659, 2002.

KOMA, D. *et al.* Biodegradation of long-chain n-paraffins from waste oil of car engine by *Acinetobacter* sp. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 1, p. 94-96, 2001.

LACERDA, L. D.; ITTEKKOT, V.; PATCHINEELAM, S. R. Biogeochemistry of mangrove soil organic matter: a comparison between *Rhizophora* and *Avicennia* soil in south – eastern Brazil. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 40, p. 713 – 720, 1995.

LE DRÉAU, Y. *et al.* Hydrocarbon balance of a site which had been highly and chronically contaminated by petroleum wastes of a refinery (from 1956 to 1992). **Marine Pollution Bulletin**, v. 34, n. 6, p. 456-468, 1997.

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

LIANG, J.-B. *et al.* Recovery of novel bacterial diversity from mangrove sediment. **Marine Biology**, v. 150, p. 739-747, 2007.

LIU, W-T. *et al.* Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4516-4522, 1997.

LOPES, J. A. D. **Estudo de biomarcadores em óleos do Campo Fazenda Belém, Bacia Potiguar: identificação de 3-álquil- e 3-carboxialquil esteranos, constituintes de uma nova classe de biomarcadores.** Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 199 p., 1995.

LOZUPONE, C. A.; KNIGHT, R. Global patterns in bacterial diversity. **PNAS**, v. 104, n. 27, p. 11436-11440, 2007.

MACCORMACK, W. P.; FRAILE, E. R. Characterization of a hydrocarbon degrading psychrotrophic antarctic bacterium. **Antarctic Science**, v.9, n.2, p. 150-155, 1997.

MACNAUGHTON, S. J. *et al.* Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3566-3574, 1999.

MAENG, J. H. *et al.* Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of n-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. Strain M-1. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 13, p. 3695-3700, 1996.

MAGURANN, A. E. **Measuring Biological Diversity.** Blackwell Publishing, Oxford, 268 p., 2004.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel.** Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 162 p., 2006.

MARSH, T. L. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 323-327, 1999.

_____. Culture-independent microbial community analysis with Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism. **Methods in Enzymology**, v. 397, p. 308-329, 2005.

MARTIN, F.; LANA, P. C. Aspectos Jurídicos à Proteção dos Manguezais da Baía de Paranaguá (Paraná, Brasil). **Anais do III Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira.** ACIESP., v. 1, p. 105-112, 1993.

MERCURIO, P.; BURNS, K. A.; NEGRI, A. Testing the ecotoxicology of vegetable versus mineral based lubricating oils: 1. Degradation rates using tropical marine microbes. **Environmental Pollution**, v. 129, p. 165-173, 2004.

MILLS, M. A. *et al.* Intrinsic bioremediation of a petroleum-impacted wetland. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 887-899, 2003.

MOLNAR, M. *et al.* Effect of RAMEB on bioremediation of different soils contaminated with hydrocarbons. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 44, p. 447-452, 2002.

MUCKIAN, L. *et al.* Bacterial community structure in soils contaminate by polycyclic aromatic hydrocarbons. **Chemosphere**, v. 68, p. 1535-1541, 2007.

MUNOZ, D. *et al.* Long term evolution of petroleum biomarkers in mangrove soil (Guadeloupe). **Marine Pollution Bulletin**, v. 34, n. 11, p. 868-874, 1997.

NOORDMAN, W. H. *et al.* The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability. **Journal of Biotechnology**, v. 94, p. 195-212, 2002.

OH, Y-S.; SIM, D-S.; KIM, S-J. Effects of nutrients on crude oil biodegradation in the upper intertidal zone. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 12, p. 1367-1372, 2001.

OKOH, A. I. Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 1, n. 2, p. 38-50, 2006.

OLIVERA, N. L.; ESTEVES, J. L.; COMMENDATORE, M. G. Alkane biodegradation by a microbial community from contaminated sediments in Patagonia, Argentina. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 40, p. 75-79, 1997.

OSBORN, A. M.; MOORE, E. R. B.; TIMMIS, K. N. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. **Environmental Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 39-50, 2000.

PACE, N. R. A molecular view of microbial biodiversity and the biosphere. **Science**, v. 276, p. 734-740, 1997.

PEPI, M. *et al.* An antarctic psychrotrophic bacterium *Halomonas* sp. ANT-3b, growing on n-hexadecane, produces a new emulsifying glycolipid. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, p. 157-166, 2005.

PIEPER, D. H.; MARTINS DOS SANTOS, V. A. P.; GOLYSHIN, P. N. Genomic and mechanistic insights into the biodegradation of organic pollutants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, p. 215-224, 2004.

PINI, F. *et al.* Molecular and physiological characterization of psychrotrophic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Terra Nova Bay (Antarctica). **European Journal of Soil Biology**, v.43, p. 368-379, 2007.

PROFFITT, C. E.; DEVLIN, D. J.; LINDSEY, M. Effects of oil on mangrove seedlings grown under different environmental conditions. **Marine Pollution Bulletin**, v. 30, n. 12, p. 788-793, 1995.

RAMSAY, M. A. *et al.* Effect of bioremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 41, p. 413-419, 2000.

RATAJCZAK, A.; GEIBDÖRFER, W.; HILLEN, W. Alkane hydroxylase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1 is encoded by *alkM* and belongs to a new family of bacterial integral-membrane hydrocarbon hydroxylases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1175-1179, 1998.

ROSATO, Y. B. **Biodegradação do petróleo**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Microbiologia Ambiental. 440 p. Jaguariúma: Empresa de Pesquisa Agropecuária. Cap. 14, p. 307-334, 1997.

ROSENBERG, M. *et al.* Role of thin fimbriae in adherence and growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, p. 929-937, 1982.

SANT'ANNA, E. M.; WHATELY, M. H. Distribuição dos manguezais do Brasil. **Revista Brasileira de Geografia**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 1, p. 47-63, 1981.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar**. Caribbean Ecological Research, São Paulo, 64p., 1995.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. *et al.* Brazilian mangroves. **Aquatic ecosystem health and management**, v. 3, p. 561 – 570, 2000.

SCHERRER, P.; MILLE, G. Biodegradation of crude oil in an experimentally polluted peaty mangrove soil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 20, p. 430-432, 1989.

SCHOEFS, O.; PERRIER, M.; SAMSON, R. Estimation of contaminant depletion in unsaturated soils using a reduced-order biodegradation model and carbon dioxide measurement. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 64, p. 53-61, 2004.

SCHULTE, E. E.; HOPKINS, B.G. **Estimation of soil organic matter by weight loss-on-ignition**. In: MAGDOFF, F. R.; TABATABAI, M.A.; HANLON Jr., E. A. Soil organic matter: Analysis and interpretation. Madison, p. 21-31, 1996.

SCKELSKY, A. M.; SHREVE, G. S. Kinetic model of biosurfactant-enhanced hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, p. 402-409, 1999.

SCOTT, C. C. L.; FINNERTY, W. R. Characterization of intracytoplasmic hydrocarbon inclusions from the hydrocarbon-oxidizing *Acinetobacter* species HO1-N. **Journal of Bacteriology**, v. 127, n. 1, p. 481-489, 1976.

SILVA, A. F. **Caracterização da macrofauna bentônica dos bancos areno-lamosos dos estuários dos rios Pacoti e Pirangi – Ceará, Brasil**. Dissertação de mestrado - Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, 72 p., 2006.

SILVA, M. V. N. **Impactos ambientais relacionados a derrames de hidrocarbonetos no ambiente – Icapuí – CE.** Dissertação de mestrado - Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, 144 p., 2005.

SILVA-FALCÃO, E. C.; SEVERI, W.; ROCHA, A. A. F. Dinâmica espacial e temporal de zoeas de *Brachyura* (Crustácea, Decapoda) no estuário do Rio Jaguaribe, Itamaracá, Pernambuco, Brasil. **Iheringia Séria Zoológica**, v. 97, n. 4, p. 434-440, 2007.

SINGH, B. K. *et al.* Use of multiplex terminal restriction fragment length polymorphism for rapid and simultaneous analysis of different components of the soil microbial community. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7278-7285, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA – SBM. **Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana**, 15º Suplemento Informativo, 2005. Disponível em: http://www.sbmicrobiologia.org.br/clsi_OPASM100S15.pdf. Acesso em: 07 de janeiro de 2008.

STROUD, J. L.; PATON, G. I.; SEMPLE, K. T. Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1239-1253, 2007.

SUGUIO, K. **Introdução à sedimentologia.** Editora Edgard Blucher, EDUSP, São Paulo, 317 p., 1973.

TAM, N. F. Y. *et al.* Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong Kong. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, p. 216-324, 2002.

TAN, H. M. Bacterial catabolic transposons. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 51, p. 1-12, 1999.

THRONE-HOLST, M. *et al.* Utilization of n-alkanes by a newly isolated strain of *Acinetobacter venetianus*: the role of two Alk-B-type alkane hydroxylases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 353-360, 2006.

TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 240-245, 2002.

TORSVIK, V.; SÖRHEIM, R.; GOKSÖYR, J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities: a review. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 17, p.170-178, 1996.

VAN DER MEER, J. R. *et al.* Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. **Microbiological Reviews**, v. 56, n. 4, p. 677-694, 1992.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 503-549, 2003.

VENOSA, A. D.; ZHU, X. Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. **Spill Science & Technology Bulletin**, v. 8, n. 2, p. 163-178, 2003.

VIDALI, M. Bioremediation. an overview. **Pure Applied Chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1163–1172, 2001.

VOGEL, T. M. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. **Current Opinion and Biotechnology**, v. 7, p. 311-316, 1996.

VOLKE-SEPÚLVEDA, T.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; FAVELA-TORRES, E. Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: Kinetic analysis. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1583-1591, 2006.

WALTER, M. V. *et al.* Surfactant enhances biodegradation of hydrocarbons: microcosm and field study. **Journal of Soil Contamination**, v. 6, p. 61-77, 1997.

WATKINSON, R.; MORGAN, P. Physiology of aliphatic hydrocarbon degrading microorganisms. **Biodegradation**, v. 1, p. 79–92, 1990.

WATTS, J. E. M. *et al.* Comparative analysis of polychlorinated biphenyl-dechlorinating communities in enrichment cultures using three different molecular screening techniques. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 11, p. 710-719, 2001.

WENTWORTH, C. K. A scale of grade and class term for clastic sediments. **Journal of Geology**, v. 30, p. 377-392, 1922.

WENTZEL, A. *et al.* Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 1209-1221, 2007.

WHITE, L. G.; GREER, C. W.; INNIS, W. E. Assessment of the biodegradation potential of psychrotrophic microorganisms. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 99-106, 1996.

WHITE, L. G. *et al.* Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 7, p. 2578-2584, 1998.

YU, S. H. *et al.* Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. **Environment International**, v. 31, p. 149-154, 2005.

ZHOU, J. *et al.* Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 68, n. 1, p. 326-334, 2002.

APÊNDICE

Apêndice I - Alinhamento entre as seqüências do rDNA 16S do isolado IC18 (seqüência *query*) e de *Acinetobacter* sp. J42 (seqüência *subject*), usando a ferramenta blastn (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Nucleotídeos conservados estão indicados por barras verticais.

```

Query 1  TGCAAGTCGAGCGGGGAAGGTAGCTTGTACTGGACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAT  60
          |
Sbjct 3  TGCAAGTCGAGCGGGGAAGGTAGCTTGTACTGGACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAT  62

Query 61 GCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATTCCGAAAGGAATGCTAATACCGCATA  120
          |
Sbjct 63 GCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATTCCGAAAGGAATGCTAATACCGCATA  122

Query 121 CGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCG  180
          |
Sbjct 123 CGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCG  182

Query 181 GATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAG  240
          |
Sbjct 183 GATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAG  242

Query 241 GATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  300
          |
Sbjct 243 GATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  302

Query 301 GAATATTGGACAATGGGGGAACCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTT  360
          |
Sbjct 303 GAATATTGGACAATGGGGGAACCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTT  362

Query 361 ATGTTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTAGTATTAATACTACTGGATAGTG  420
          |
Sbjct 363 ATGTTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTAGTATTAATACTACTGGATAGTG  422

Query 421 GACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAG  480
          |
Sbjct 423 GACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAG  482

Query 481 GGTGCGAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGCCATTTAAGTCA  540
          |
Sbjct 483 GGTGCGAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGCCATTTAAGTCA  542

Query 541 AATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTGATACTGGATGGCTAGAGTATG  600
          |
Sbjct 543 AATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTGATACTGGATGGCTAGAGTATG  602

Query 601 GGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACC  660
          |
Sbjct 603 GGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACC  662

Query 661 GATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCA  720
          |
Sbjct 663 GATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCA  722

Query 721 AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCC  780
          |
Sbjct 723 AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCC  782

```

```

Query 781 TTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCA 840
      |
Sbjct 783 TTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCA 842

Query 841 AGACTAAAAC TCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAAT 900
      |
Sbjct 843 AGACTAAAAC TCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAAT 902

Query 901 TCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATACTAGAAACTTTCCAGAGATGGA 960
      |
Sbjct 903 TCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATACTAGAAACTTTCCAGAGATGGA 962

Query 961 TTGGTGCCTTCGGGAATCTAGATACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 1020
      |
Sbjct 963 TTGGTGCCTTCGGGAATCTAGATACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 1022

Query 1021 GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCCTTACTTGCCAGCATTTCCGA1080
      |
Sbjct 1023 GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCCTTACTTGCCAGCATTTCCGA1082

Query 1081 TGGGAAC TTTAAGGATACTGCCAGTGACAAACTGGAGGAAGGCGGGGACCGACGTCAAGT1140
      |
Sbjct 1083 TGGGAAC TTTAAGGATACTGCCAGTGACAAACTGGAGGAAGGCGGGGAC-GACGTCAAGT1141

Query 1141 CATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTG1200
      |
Sbjct 1142 CATCATGGCCCTTACGGCCAGGGC-TACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTG1200

Query 1201 CTACCTAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCA1260
      |
Sbjct 1201 CTACCTAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCA1260

Query 1261 ACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGA-TAC1319
      |
Sbjct 1261 ACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATAC1320

Query 1320 GTTCCCGGGCCTTGTACACTACCGCCGTCACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGTA1379
      |
Sbjct 1321 GTTCCCGGGCCTTGTACAC-ACCGCCGTCACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGTA1379

Query 1380 G 1380
      |
Sbjct 1380 G 1380
    
```