



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA (RENORBIO)
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

ALYSSON LIRA ANGELIM

**SELEÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE CONSÓRCIOS DE BACTÉRIAS
HIDROCARBONOCLÁSTICAS E PRODUTORAS DE COMPOSTOS
ATIVOS DE SUPERFÍCIE PARA APLICAÇÕES EM PROCESSOS DE
BIORREMEDIAÇÃO**

ORIENTADORA: DRA. VÂNIA MARIA MACIEL MELO

FORTALEZA-CE

2012

ALYSSON LIRA ANGELIM

**SELEÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE CONSÓRCIOS DE BACTÉRIAS
HIDROCARBONOCLÁSTICAS E PRODUTORAS DE COMPOSTOS
ATIVOS DE SUPERFÍCIE PARA APLICAÇÕES EM PROCESSOS DE
BIORREMEDIAÇÃO**

Tese submetida à coordenação do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará (RENORBIO-UFC) como requisito para obtenção do grau de Doutor. Área de concentração: Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

FORTALEZA-CE

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- A591s Angelim, Alysson Lira.
Seleção e imobilização de consórcios de bactérias hidrocarbonoclásticas e produtoras de compostos ativos de superfície para aplicações em processos de biorremediação / Alysson Lira Angelim – 2012.
149 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO - UFC, Fortaleza, 2012.
Área de Concentração: Biotecnologia Industrial.
Orientação: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.
- 1.Manguezal. 2.Quitosana. 3.Hidrocarbonetos. 4.Emulsificantes. I. Título.

CDD 660.6

ALYSSON LIRA ANGELIM

**SELEÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE CONSÓRCIOS DE BACTÉRIAS
HIDROCARBONOCLÁSTICAS E PRODUTORAS DE COMPOSTOS
ATIVOS DE SUPERFÍCIE PARA APLICAÇÕES EM PROCESSOS DE
BIORREMEDIAÇÃO**

Tese submetida à Coordenação do Programa de
Doutorado em Biotecnologia da Universidade
Federal do Ceará (RENORBIO-UFC) como
requisito para obtenção do grau de Doutor. Área
de concentração: Biotecnologia Industrial.

Aprovada em 29 / 08 / 2012

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Vânia Maria Maciel Melo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Dra. Adriana Ururahy Soriano
Cenpes-PETROBRAS

Prof. Dr. Afrânio Aragão Craveiro
Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC)

Profª. Dra. Maria Valdevez Ponte Rocha
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro
Universidade Federal do Ceará

**Dedico esta tese aos meus Pais,
Ulisses Angelim Neto e Guiomar Lira Angelim.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir estar aqui e sempre me proteger, pela saúde que me foi concedida, e por ter sempre iluminado meu caminho.

Aos meus pais Ulisses e Guiomar pelo amor incondicional, por terem investido na minha educação, pela preocupação constante com meu bem-estar e por todo incentivo para que eu chegasse até aqui. Tudo que sou hoje devo a vocês! Às minhas irmãs Vanessa e Gessica pelo apoio, respeito e carinho. Amo muito todos!

À Samantha por tornar mais leve minha rotina no laboratório, por sempre me incentivar e apoiar na execução dos projetos, pela amizade e pelos felizes momentos de convivência. Gostaria de agradecer também por sempre ter sido uma das pessoas mais presentes na minha vida, por ter conquistado meu coração e se tornado a mulher que escolhi para estar ao meu lado e construir um futuro repleto de felicidades. Te amo!

À Profª. Dra. Vânia Maria Maciel Melo, pela orientação, incentivos e constantes conselhos edificantes, por contribuir para meu crescimento no âmbito pessoal e profissional, e pela dedicação e carinho demonstrado durante esses 8 anos trabalhando juntos, que resultaram em uma grande amizade e admiração.

À Profª. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha pelas correções e sugestões durante a qualificação, que muito contribuíram para melhorar meu trabalho de tese, por aceitar participar e avaliar meu trabalho novamente na defesa.

Ao Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro pelas relevantes sugestões na avaliação deste trabalho, pelo conhecimento transmitido durante minha formação acadêmica e pela amizade.

À Dra. Adriana Ururahy Soriano pela gentileza de aceitar avaliar meu trabalho de tese e pela participação na banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Afrânio Aragão Craveiro pela gentileza de aceitar avaliar meu trabalho de tese e pela participação na banca examinadora.

À Profª. Dra. Sueli por suas correções na qualificação e sugestões para melhorar a qualidade do trabalho final.

Ao Prof. Dr. Francisco Erivan de Abreu Melo pela parceria efetiva nos projetos relacionados à tese, pelos agradáveis momentos de convivência e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento por permitir usar a infraestrutura de seu laboratório e pelos conhecimentos adquiridos sobre cromatografia gasosa. Gostaria também de agradecer aos seus estudantes Ary e Clerton pela ajuda durante a utilização do cromatógrafo gasoso.

Ao Prof. Dr. Eduardo Barros do Laboratório de Microscopia Avançada (LMA) por permitir usar sua infraestrutura e ajudar na realização das microscopias eletrônicas de varredura.

Ao Dr. Cesar Rossas Mota Filho pela orientação e acolhida durante meu estágio na Inglaterra na universidade de Newcastle, onde tive a oportunidade de aprender as técnicas de *Quantitative PCR* (q-PCR) e *Fluorescent in situ hybridization* (FISH).

À Profa. Dra. Vivian Pellizari do departamento de Microbiologia do ICB-USP pelo convite para participar do curso *Stable Isotope Probing: A short course* sobre DNA-SIP e pelo treinamento na técnica Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis-DGGE).

Aos pesquisadores envolvidos no projeto da Universidade Federal da Bahia pela ajuda durante as coletas e montagem dos experimentos, e pela parceria desenvolvida.

A todos os professores que durante a graduação e pós-graduação contribuíram para a minha formação acadêmica.

À Lucy Eland por ser minha parceira para todas as horas durante o estágio na Inglaterra. Pela ajuda nos trabalhos no laboratório e pela companhia sempre agradável.

À Lidianne pela parceria constante durante todo o doutorado, tanto cursando disciplinas como realizando experimentos, e pela amizade durante todos os anos que convivemos juntos.

À Vanessa Nogueira por muitas vezes ajudar nas discussões dos experimentos, pela agradável companhia e amizade nesses anos de trabalho.

Ao Lyanderson por ter me ajudado na realização dos experimentos na pesquisa de surfactantes, e pela amizade, agradável companhia e conversas descontraídas.

À Wal pela parceria, ajuda nos experimentos, conselhos, e pelas conversas sempre agradáveis.

À Bárbara pela dedicação e competência em ajudar quando precisei, sempre com disposição, vontade de aprender e vencer desafios. Pela agradável companhia, cumplicidade e amizade.

Ao Leonardo pela ajuda no momento de fazer os gráficos e figuras, nas análises estatísticas e na formatação da tese. Quero agradecer também pelos bons momentos de convivência e pela amizade.

Ao Júlio, Glauber e Caio amigos de muitos anos que conquistei durante esta caminhada e que sempre estiveram ao meu lado me apoiando tanto como ouvintes ou como bons conselheiros. Pelos ótimos momentos de alegria vivenciados, pelo respeito e cumplicidade.

À Denise por sempre me ajudar tanto no laboratório como na vida pessoal. E por ser uma das melhores amigas que possuo.

Ao meu amigo Clark, que sempre me apoiou, foi um bom conselheiro nos momentos difíceis e torceu por mim durante estes anos de doutorado.

A todos meus amigos do LEMBIOTECH de diferentes gerações: Andréia, Camila, Elis, Fernanda, Geórgia, Gustavo, Hortência, Kizeane, Laís, Lilian, Luína, Luís, Manu, Melissa, Natasha, Nathália, Raphaela, Sasha, Tallita, Tecia e Vanessa Câmera por terem sempre ajudado e tornado os dias de trabalho mais felizes e divertidos. E por terem se tornado pessoas importantes e queridas na minha vida.

Ao Valdenor, pessoa que está sempre de bem com a vida e que para mim é um exemplo de que podemos ser felizes sempre, basta como ele sempre diz “o salário estar em dia e Deus nos dar saúde”. Por sempre ter me ajudado quando o solicitei e pela amizade.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a execução deste trabalho.

FONTES FINANCIADORAS

- Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO)- suporte financeiro para participação em eventos e estágios.
- Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)- concessão das bolsas e auxílio à pesquisa.
- Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Parque de Desenvolvimento Tecnológico do Ceará (PADETEC) e Petróleo Brasileiro S/A (PETROBRAS)- fomento do projeto realizado na Rede Cooperativa em Recuperação de Áreas Contaminadas por Atividades Petrolíferas (RECUPETRO).
- *American Society for Microbiology (ASM)*- financiamento do curso *Stable Isotope Probing: A short course* sobre DNA-SIP realizado na Universidade de São Paulo- USP.
- Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia (CBAB/CABBIO)- realização do curso *Enfoques metagenômicos en biorremediación* em Puerto Madryn-Chubut, Argentina.

RESUMO

A região norte do manguezal da Baía de Todos-os-Santos (BTS) encontra-se cronicamente contaminada com as frações mais recalcitrantes do petróleo. Dentre as iniciativas para mitigar esse passivo ambiental, destaca-se a criação em 2001 da Rede Cooperativa em Recuperação de Áreas Contaminadas por Atividades Petrolíferas (RECUPETRO), apoiada pela Petrobras e FINEP, tendo como um dos objetivos desenvolver processos de biorremediação. Um desses processos envolveu a seleção e preparação de consórcios de bactérias capazes de degradar hidrocarbonetos e produzir compostos ativos de superfície (SACs) imobilizados em quitosana. Para o isolamento de consórcios bacterianos, adotou-se a técnica de enriquecimento usando petróleo, querosene, hexadecano, ou uma mistura de três hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). O crescimento durante o enriquecimento foi confirmado pela turvação do meio e contagem de células viáveis. As culturas selecionadas com HPAs também foram monitoradas por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) para verificar a dinâmica das populações de bactérias ao longo de 45 dias de enriquecimento. Os micro-organismos de cada consórcio foram identificados por sequenciamento do rDNA 16S e avaliados em relação a resistência ao processo de imobilização em quitosana e produção de SACs. As esferas de quitosana produzidas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O consórcio obtido do enriquecimento com petróleo foi testado na biorremediação de sedimentos da BTS e seu desempenho avaliado por contagens de células viáveis, DGGE e quantificação da biodegradação por cromatografia gasosa. Como resultados deste trabalho, foram obtidos 39 isolados bacterianos pertencentes a 20 gêneros. Os micro-organismos foram capazes de crescer usando petróleo ou seus derivados como fontes de carbono e de produzir SACs (biossurfactante, bioemulsificante e biodesemulsificante). Os consórcios foram aprisionados com sucesso em esferas de quitosana e a MEV confirmou a presença de poros de superfície essenciais para funcionalidade do produto. Nos experimentos de biorremediação em microcosmo, o aprisionamento do consórcio dentro das esferas propiciou o crescimento celular até 15 dias. Nesse período, ocorreu o processo de desintegração das esferas e a liberação da biomassa para o sedimento, sendo o bioaumento comprovado por DGGE. A matriz de quitosana demonstrou atividade prebiótica nas comunidades bacterianas autóctones. Logo, as esferas com bactérias imobilizadas contemplam os processos de bioaumento e bioestímulo. Apesar da bioaugmentação confirmada nos microcosmos, não foram detectadas reduções significativas dos poluentes medidos após 90 dias de biodegradação, revelando que apenas o aumento do número de células não foi suficiente para reduzir os contaminantes recalcitrantes no sedimento da BTS nas condições experimentais adotadas.

Palavras chaves: manguezal, quitosana, hidrocarbonetos, emulsificantes.

ABSTRACT

The northern region of Todos os Santos Bay (TSB) mangrove is chronically contaminated by recalcitrant petroleum hydrocarbons. Among the initiatives to mitigate the environmental impacts in this mangrove, the RECUPETRO network (Rede Cooperativa em Recuperação de Áreas Contaminadas por Atividades Petrolíferas) was created in 2001, supported by Petrobras and FINEP, aiming at developing bioremediation processes. One of those processes involved the use of bacterial consortia able to degrade hydrocarbons and produce surface active compounds (SACs) immobilized on chitosan. In order to isolate bacterial consortia, we chose the enrichment technique using petroleum, kerosene, hexadecane or a mixture of three polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), where the cultures growth was confirmed by turbidity and viable cell counts. The enrichment using PAHs was also monitored by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in order to investigate the bacterial population dynamics during 45 days of enrichment. The micro-organisms of each consortium were identified by sequencing the gene encoding rRNA16S and evaluated for resistance to the immobilization process on chitosan and SACs production. The chitosan beads obtained were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). Microcosms bioremediation assays using contaminated sediments from TSB were carried out using the bacterial consortium isolated from petroleum enrichment and its performance was evaluated by bacterial cell counts and DGGE. The biodegradation efficiency was also measured by gas chromatography. As results of this study, it was obtained 39 bacterial isolates belonging to 20 different genera. The micro-organisms were able to grow using petroleum or its derivatives as carbon sources and to produce SACs (biosurfactant, bioemulsifier and biodemulsifier). Consortia were successfully entrapped in chitosan beads and the SEM confirmed the presence of surface pores, which are essential to the product functionality. In bioremediation experiments using microcosm, the entrapment of consortium within the beads allowed cell growth up to 15 days. At this point, the beads were disintegrated and the biomass was released to the sediment, being the bioaugmentation confirmed by DGGE. The chitosan matrix showed prebiotic activity in the indigenous bacterial communities. Therefore, the beads containing immobilized bacteria contemplate the processes of bioaugmentation and biostimulation. Despite the confirmed bioaugmentation in microcosms, it was not detected significant reductions in the measured pollutants after 90 days of experiment, proving that only the increase in cell number was not sufficient to reduce recalcitrant contaminants at TSB under the experimental conditions adopted.

Keywords: mangrove, chitosan, hydrocarbons, emulsifiers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1- Mapa da distribuição das áreas de manguezais no mundo ressaltadas em verde. Fonte: GIRI <i>et al.</i> , 2011.....	21
Figura 2.2- Distribuição da área mundial de manguezais representada por países. Fonte dos dados: GIRI <i>et al.</i> , 2011.....	21
Figura 2.3- Rotas microbianas aeróbias e anaeróbias de utilização de compostos aromáticos.	28
Figura 2.4- Principais métodos de imobilização. Fonte: Adaptado de Bickerstaff, 1997.....	34
Figura 2.5- Aspecto da fibra de quitosana.....	37
Figura 2.6- Estrutura química da quitina (A) e quitosana (B). Fonte: KURITA, 2006.	38
Figura 2.7- Esquema do DGGE. Fonte: Adaptado de ALVAREZ; ILLMAN, 2006.	43
Figura 4.1- Área de coleta e ponto de amostragem evidenciado em vermelho.....	53
Figura 4.2- Aspecto do ecossistema manguezal no local de amostragem (A), coleta do sedimento com amostrador de PVC (B) e detalhe da contaminação oleosa no testemunho do sedimento (C).	54
Figura 4.3- Aspecto das culturas de enriquecimento e dos subcultivos em placas de ATGE-salino após 45 dias.....	55
Figura 4.4- Morfologia colonial dos isolados obtidos nos diferentes enriquecimentos distribuídos por consórcios: HPA (A), Querosene (B), Hexadecano (C), Petróleo (D).....	56
Figura 4.5- Análise de agrupamento dos perfis gerados por DGGE com gradiente de desnaturação 35-65% das comunidades nos diferentes períodos (T0, T15, T30, T45) do enriquecimento com HPAs.	57
Figura 4.6- Variação do número de UTOs durante o processo de enriquecimento com HPAs.	58
Figura 4.7- DGGE gerado com gradiente de desnaturação 35-65% evidenciando a correspondência de mobilidade de bandas dos 7 isolados (H1-H7) do consórcio HPAs com as UTOs presentes aos 45 dias de enriquecimento.....	58
Figura 4.8- Distribuição por filo dos isolados bacterianos identificados e por classe do filo Proteobacteria.....	61
Figura 4.9- Árvore filogenética construída a partir do alinhamento múltiplo das sequências do gene codificador para o rRNA16S das 37 linhagens identificadas. As relações entre as sequências foram estabelecidas com o algoritmo <i>neighbor-joining</i> com	

	base na distância Euclidiana entre as mesmas. A estabilidade dos dados foi inferida pelo teste de <i>bootstrap</i> com 1.000 reamostragens. Os valores de <i>bootstrap</i> são encontrados nos nós.....	62
Figura 4.10-	Representação da distribuição de gêneros bacterianos em consórcios obtidos por diferentes enriquecimentos.	63
Figura 4.11-	Monitoramento de crescimento dos consórcios bacterianos em meio mineral com glicerol.	65
Figura 4.12-	Variação de pH durante o crescimento do consórcio QUE em meio mineral com glicerol.	65
Figura 4.13-	Percentuais de emulsificações das cepas e do consórcio HPA. Letras iguais dentre os diferentes tempos em cada isolado bacteriano significam resultados estatisticamente iguais ($p>0,05$), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com um pós-teste de Tukey.	67
Figura 4.14-	Percentuais de emulsificações das cepas e do consórcio QUE. Letras iguais dentre os diferentes tempos em cada isolado bacteriano significam resultados estatisticamente iguais ($p>0,05$), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com um pós-teste de Tukey.	67
Figura 4.15-	Percentuais de emulsificações das cepas e do consórcio PET. Letras iguais dentre os diferentes tempos em cada isolado bacteriano significam resultados estatisticamente iguais ($p>0,05$), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com um pós-teste de Tukey.	68
Figura 4.16-	Percentuais de emulsificações das cepas e do consórcio HEX. Letras iguais dentre os diferentes tempos em cada isolado bacteriano significam resultados estatisticamente iguais ($p>0,05$), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com um pós-teste de Tukey.	69
Figura 4.17-	Representação dos tipos de emulsões óleo-água O/A (A) e água-óleo A/O (B) produzidos pelas cepas PETBA16 e PETBA03, respectivamente.	70
Figura 4.18-	Aspecto do controle positivo constituído por uma emulsão do meio mineral em querosene utilizando <i>Tween</i> 80 (A) e sua desemulsificação após tratamento com a cultura da cepa PETBA16 (B).....	71
Figura 4.19-	Percentuais de emulsificação dos consórcios PET e QUE, dos consórcios sem as linhagens desemulsificantes (PET-D e QUE-D) e do consórcio PET sem as cepas de <i>Gordonia</i> e produtoras de desemulsificante (PET-DG). Letras iguais entre cada consórcio e suas variações significam resultados estatisticamente	

iguais ($p>0,05$), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com um pós-teste de Tukey.	72
Figura 4.20- Aspecto das emulsões (A/O) de água e querosene produzidas pelos consórcios HPA (A), QUE (B), QUE-D (C) e PET-DG (D). As fotos foram realizadas com aumento de 100X.....	73
Figura 4.21- Aspecto das macroemulsões produzidas pelas linhagens PETBA16 (A) e QUEBA05 (B). As fotos foram realizadas com aumento de 100X.	73
Figura 4.22- Aspecto da formação de biopolímeros (A e B) produzidos pela linhagem QUEBA 05 revelado por microscopia de contraste de fase. Foi utilizado o aumento da máquina digital para fotografar os biopolímeros.....	74
Figura 4.23- Coleta de borras oleosas dispersas no sedimento do manguezal da Baía de Todos-os-Santos (A) e armazenamento do material coletado em recipientes de ferro (B).	76
Figura 5.1- Coleta de sedimento do manguezal da Baía de Todos-os-Santos, Bahia e representação das três porções: 0-10 cm, 10-20 cm e 20-30 cm.....	105
Figura 5.2- Aspecto dos aquários usados para montagem dos microcosmos nos ensaios de biorremediação utilizando sedimento de manguezal contaminado com borra oleosa.	106
Figura 5.3- Formação (A) e aspecto morfológico de esferas de quitosana com consórcio de micro-organismos imobilizados (B).	113
Figura 5.4- Demonstração do resultado negativo de dois isolados (QUEBA01 e QUEBA02) analisados para produção de quitosanase e controle positivo utilizando uma linhagem de <i>Bacillus</i> sp.	114
Figura 5.5- Aspecto das esferas de quitosana (A), aspecto do interior das esferas (B), poros presentes na superfície das esferas (C) e aspecto das células bacterianas imobilizadas no interior das esferas (D).	115
Figura 5.6- Aspecto da superfície das esferas de quitosana evidenciando o tamanho dos poros.	116
Figura 5.7- Efeito da decomposição das esferas de quitosana nas comunidades microbianas de sedimento de manguezal. Letras diferentes entre colunas demonstram diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p<0,05$). O teste estatístico utilizado foi a análise de variância com um pós-teste de Tukey.	117

Figura 5.8- Máquina de produção em maior escala de esferas de quitosana (MEQ) (A), detalhe dos cabeçotes injetores (B) e aspecto morfológico das esferas produzidas (C).....	118
Figura 5.9- Manutenção da viabilidade de células bacterianas imobilizadas nas esferas de quitosana no decorrer do tempo de armazenamento. Letras iguais entre as colunas significam resultados estatisticamente iguais ($p>0,05$), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com um pós-teste de Tukey.....	119
Figura 5.10- Quantificação de bactérias heterotróficas totais em microcosmos nas condições de biorremediação: atenuação natural (AN), esferas de quitosana (EQ) e esferas de quitosana com consórcio bacteriano imobilizado (EQC). Letras diferentes entre as colunas em cada tratamento demonstram diferenças estatísticas entre os tempos ($p<0,05$), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com um pós-teste de Tukey.....	120
Figura 5.11- Análise das concentrações das frações 2, 3A, 3B e 4 dos HTP nos tratamentos de biorremediação: Atenuação Natural (A), Esfera de quitosana (B) e Esfera de quitosana com consórcio bacteriano (C). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tempos em cada grupo ($p<0,05$) utilizando análise de variância com pós-teste de Tukey.....	121
Figura 5.12- Aspecto do material utilizado no processo de extração do DNA metagenômico das amostras de sedimento de manguezal contaminadas com petróleo. Aparência das luvas utilizadas (A) e dos tubos de extração de DNA (B).....	122
Figura 5.13- Imagem do gel de DGGE com gradiente de desnaturação 35-65% utilizando as reações de PCR dos diferentes tratamentos de biorremediação. As amostras estão representadas por AN (Atenuação Natural), EQ (Esfera de quitosana) e EQC (Esfera de quitosana com consórcio bacteriano) seguido pelo tempo de coleta nos microcosmos. Foi utilizado o marcador de 50 bp DNA Step Ladder, G4521 (Promega Corporation, USA).	123
Figura 5.14- O Gel de DGGE durante análise no BioNumerics evidenciando as diferentes UTOs marcadas com bandas verdes.....	124
Figura 5.15- Análise de agrupamento dos perfis de UTOs obtidos por DGGE das condições experimentais avaliadas representadas por AN, EQ e EQC seguido pelo tempo de coleta nos microcosmos.	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1- Lista de alguns gêneros de bactérias e fungos degradadores de HPAs.	29
Tabela 4.1- Identificação molecular dos isolados bacterianos baseado nas sequências do gene codificador para o rRNA16S com seus respectivos números de acesso no GenBank e tamanhos em pares de base (pb).....	60
Tabela 4.2- Diversidade de gêneros/família correspondente a cada filo e classe.....	61
Tabela 5.1- Avaliação da resistência dos isolados bacterianos ao gel de quitosana em pH 3,0 e 5,0.....	111
Tabela 5.2- Avaliação da resistência dos isolados bacterianos ao contato de 3 h em soluções de NaCl 0,9% (m/v) nos valores de pH 5,0 e 12 e solução de TPP 1% (m/v) pH 9,0.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATGE: Agar Triptona Glicose Extrato de levedura
ATGE-salino: Agar Triptona Glicose Extrato de levedura com 2% NaCl (m/v)
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente
DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DNA: Ácido Desoxirribonucléico
dNTP: desoxinucleotídeo trifosfato
EPA: Environmental Protection Agency
GPS: Global Position System
HPA: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis
mM: Milimolar
MOT: Matéria Orgânica Total
NCBI: National Center for Biotechnology Information
nm: Nanômetros
pb: Pares de bases
PCR: Polymerase Chain Reaction
pH: Potencial Hidrogeniônico
RDP: Ribossomal Database Project
rRNA: Ácido ribonucleico ribossomal
SACs: Surface Active Compounds
TGE: Triptona-Glicose-Extrato de Levedura
TPP: Tripolifosfato de Sódio
UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
UTO: Unidade Taxonômica Operacional
 μ L: microlitro
 μ M: micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	O ECOSISTEMA MANGUEZAL	21
2.2	CONTAMINAÇÃO DE MANGUEZAIS POR PETRÓLEO.....	24
2.3	DIVERSIDADE MICROBIANA E BIODEGRADAÇÃO	26
2.4	BIORREMEDIAÇÃO	29
2.5	IMOBILIZAÇÃO	34
2.6	COMPOSTOS ATIVOS DE SUPERFÍCIE (<i>SURFACE ACTIVE COMPOUNDS</i> - SACs)	39
2.7	TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS A ESTUDOS DE BIORREMEDIAÇÃO	40
3	OBJETIVO GERAL.....	44
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4	CAPÍTULO 1. RIQUEZA DE BACTÉRIAS HIDROCARBONOCLÁSTICAS E PRODUTORAS DE COMPOSTOS ATIVOS DE SUPERFÍCIE RECUPERADA DE SEDIMENTOS DO MANGUEZAL DA BAÍA DE TODOS-OS-SANTOS, BAHIA.....	45
4.1	INTRODUÇÃO	46
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.2.1	Coleta e caracterização de sedimentos	47
4.2.2	Seleção de consórcios de bactérias hidrocarbonoclásticas	48
4.2.3	Análise do enriquecimento por Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)	49
4.2.4	Identificação molecular dos isolados bacterianos e análise filogenética...	50
4.2.5	Pesquisa de compostos ativos de superfície (SACs).....	51
4.2.6	Análise das emulsões por microscopia	53
4.3	RESULTADOS.....	53
4.3.1	Coleta e caracterização das amostras	53
4.3.2	Enriquecimento e isolamento de consórcios de bactérias hidrocarbonoclásticas	55
4.3.3	Monitoramento do enriquecimento com HPAs por DGGE.....	57

4.3.4	Identificação molecular dos consórcios bacterianos e análise filogenética	59
4.3.5	Produção de SACs e caracterização das emulsões	64
4.4	DISCUSSÃO	75
4.5	CONCLUSÕES	97
5	CAPÍTULO 02. IMOBILIZAÇÃO DE CONSÓRCIOS DE BACTÉRIAS HIDROCARBONOCLÁSTICAS EM ESFERAS DE QUITOSANA PARA APLICAÇÕES EM PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO	98
5.1	INTRODUÇÃO	99
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	100
5.2.1	Protocolo para formação de esferas de quitosana	100
5.2.2	Avaliação da susceptibilidade ao gel de quitosana e ao processo de imobilização	101
5.2.3	Produção da enzima quitosanase	101
5.2.4	Análise das esferas de quitosana por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	102
5.2.5	Imobilização e quantificação da densidade de células bacterianas imobilizadas	103
5.2.6	Avaliação da degradabilidade das esferas de quitosana em água e sedimento	103
5.2.7	Efeito das esferas de quitosana sobre a microbiota de sedimento de manguezal	104
5.2.8	Produção em larga escala de esferas de quitosana	104
5.2.9	Determinação do tempo de prateleira de esferas de quitosana com consórcios bacterianos imobilizados	105
5.2.10	Ensaio de aplicação in situ de esferas de quitosana com e sem consórcios bacterianos imobilizados em microcosmos utilizando sedimento de manguezal contaminado com petróleo	105
5.3	RESULTADOS	109
5.3.1	Protocolo para produção de esferas de quitosana	109
5.3.2	Avaliação da susceptibilidade ao gel de quitosana e ao processo de imobilização	110
5.3.3	Produção de quitosanase	114

5.3.4	Análise das esferas de quitosana por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	115
5.3.5	Imobilização e quantificação da densidade de células bacterianas imobilizada.....	116
5.3.6	Avaliação da degradabilidade das esferas de quitosana em água e sedimento	117
5.3.7	Efeito das esferas de quitosana sobre a microbiota de sedimento de manguezal	117
5.3.8	Produção em larga escala de esferas de quitosana	118
5.3.9	Determinação do tempo de prateleira de esferas de quitosana com consórcios bacterianos imobilizados	119
5.3.10	Ensaio de aplicação in situ de esferas de quitosana com e sem consórcios de micro-organismos imobilizados em microcosmos de sedimentos do manguezal da Baía de Todos-os-Santos	120
5.4	DISCUSSÃO	126
5.5	CONCLUSÕES	135
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	136
7	REFERÊNCIAS.....	137

1 INTRODUÇÃO

A biorremediação é uma alternativa eficaz, economicamente viável e ambientalmente amigável para recuperação de áreas impactadas por petróleo. Essa tecnologia pode utilizar micro-organismos, livres ou imobilizados, para remover ou reduzir a concentração de poluentes no ambiente. Todavia, qualquer tentativa de aplicação de biorremediação deve começar conhecendo-se a comunidade microbiana local, os contaminantes e as características ambientais da área contaminada. A caracterização das comunidades microbianas e suas respostas a poluentes, por exemplo, são agora rapidamente obtidas com o emprego de técnicas moleculares independentes de cultivo, facilitando a escolha da técnica de remediação mais apropriada, assim como o seu monitoramento.

A Baía de Todos-os-Santos, localizada no estado da Bahia, é a maior baía navegável do Brasil. A face dessa baía está voltada para o mar e tem cerca de 450 km recobertos por floresta de mangue. Na região nordeste da Baía de Todos-os-Santos foi implantado há mais de 50 anos um polo petroquímico, tendo sido registrados, desde então, vários acidentes de derramamentos de óleo, tendo como principal consequência à contaminação do manguezal do seu entorno. Embora a adoção de práticas mais seguras das atividades petrolíferas na região tenha contribuído significativamente para a redução de acidentes, o passivo ambiental em áreas desse manguezal justifica todos os esforços para sua recuperação.

O presente projeto se propõe a desenvolver um produto a base de consórcios de bactérias degradadoras de petróleo e produtoras de SACs imobilizados por aprisionamento em esferas constituídas de quitosana. Este biomaterial poderá ser empregado diretamente em tratamento de ambientes contaminados com petróleo *in situ*, ou ainda, em tratamentos de materiais contaminados *ex situ* como em bioreatores ou limpeza de tanques de armazenamento de óleo.

A inovação e diferencial do produto aqui proposto residem nas vantagens da utilização de consórcios microbianos imobilizados para biodegradação dos contaminantes do petróleo em relação ao uso de culturas puras não imobilizadas, comumente utilizadas, e na demanda no mercado nacional, particularmente da indústria petroquímica, visto que este produto será inédito no Brasil.

A maior eficiência deste biomaterial está relacionada à complementaridade metabólica entre os membros do consórcio bacteriano para degradar diferentes tipos de hidrocarbonetos e nas vantagens fornecidas pelo processo de imobilização de micro-

organismos, como a maior tolerância contra grandes concentrações de compostos tóxicos, maior taxa de crescimento, maior estabilidade catalítica, menor perda por lixiviação, possibilidade de reuso, além das células poderem ser mantidas estáveis e ativas por um maior período. O desenvolvimento desse novo produto significará um grande avanço em termos de inovação tecnológica para a área de biotecnologia ambiental nacional, e poderá se transformar em uma opção aos produtos importados utilizados presentemente.

Outro diferencial do produto proposto neste estudo é a utilização da quitosana como matriz para aprisionamento de bactérias para aplicações em biorremediação. O Ceará concentra o segundo maior polo produtor de camarão de cativeiro no Brasil e como consequência dessa atividade são geradas toneladas de resíduos sólidos, ricos em quitina, que podem ser utilizados para produção de quitosana por empresas locais, sendo esta uma alternativa ambientalmente correta e economicamente viável.

Nessa perspectiva, a 1^o parte desse estudo é dedicada à descrição do isolamento de bactérias hidrocarbonoclásticas a partir de amostras de sedimentos do manguezal da Baía de Todos-os-Santos, através da técnica de enriquecimento utilizando diferentes hidrocarbonetos do petróleo, e do monitoramento desses procedimentos por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis-DGGE*). Discute-se também a diversidade de gêneros encontrados e o potencial dessa comunidade para degradar hidrocarbonetos do petróleo e produzir compostos ativos de superfície (biossurfactantes, bioemulsificantes e desemulsificantes).

A 2^o parte trata da validação de um protocolo de imobilização em esferas de quitosana e da seleção de bactérias hidrocarbonoclásticas e produtoras de SACs compatíveis com esse processo, buscando-se desenvolver um produto natural, biodegradável e eficiente para mitigação da contaminação no sedimento do manguezal da Baía de Todos-os-Santos por bioaugmentação de bactérias autóctones imobilizadas em esferas de quitosana.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O ECOSISTEMA MANGUEZAL

Manguezais são ecossistemas costeiros de transição entre o ambiente terrestre e marinho, localizados em regiões tropicais e subtropicais, encontrados em 118 países e territórios (GIRI *et al.*, 2011) (FIGURA 2.1).



Figura 2.1- Mapa da distribuição das áreas de manguezais no mundo ressaltadas em verde. Fonte: GIRI *et al.*, 2011.

As áreas de manguezais em todo mundo são estimadas em 13,77 milhões de hectares e estão localizados na Ásia (42%), África (20%), América do Norte e Central (15%), Oceania (12%) e America do Sul (11%). Da área total de manguezal encontrada no planeta, aproximadamente 75% são encontrados em apenas 15 países. Os 25% restantes estão distribuídos pelos demais 103 países (GIRI *et al.*, 2011) (FIGURA 2.2).

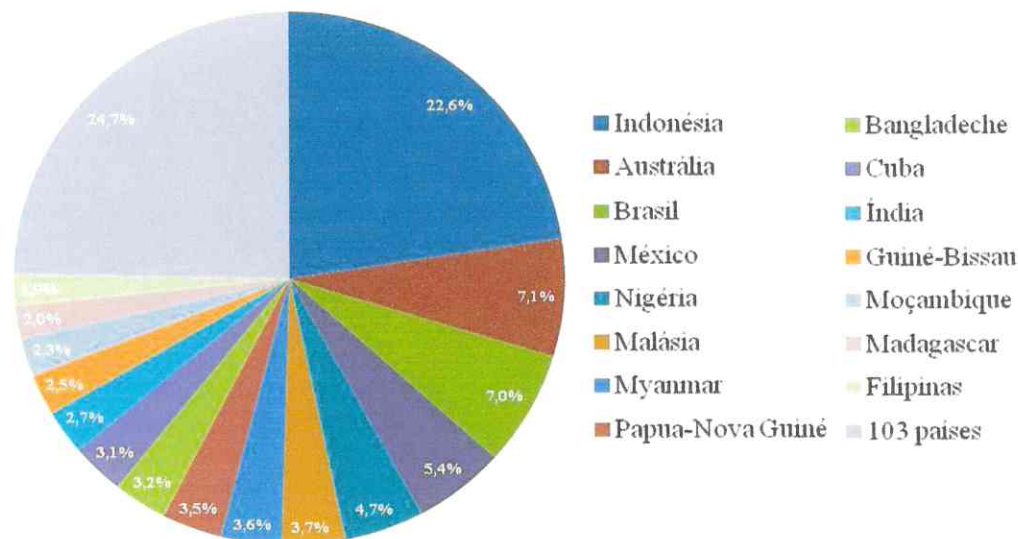


Figura 2.2- Distribuição da área mundial de manguezais representada por países. Fonte dos dados: GIRI *et al.*, 2011.

Os manguezais se caracterizam por possuírem um substrato lamoso, com baixos teores de oxigênio e grandes variações de salinidade, além de serem inundados periodicamente pela entrada diária das marés e de água doce, nutrientes e depósitos de sedimentos de rios (SPALDING; KAINUMA; COLLINS, 2010). A vegetação residente nos manguezais possui adaptações morfológicas para sobrevivência nesse ambiente, como por exemplo, as raízes aéreas, utilizadas na sustentação no solo lodoso, e os pneumatóforos, que são raízes associadas com as trocas gasosas, além da presença de alguns mecanismos fisiológicos para a exclusão do sal, que permitem o crescimento em ambientes halófilos (SPALDING; KAINUMA; COLLINS, 2010; TOMLINSON, 1986).

Esse ecossistema é encontrado ao longo do litoral brasileiro desde a região norte, no Amapá, até o sul de Santa Catarina, na foz do Rio Araranguá (VANNUCCI, 1999). Os principais gêneros de árvores típicas deste bioma no Brasil são *Rhizophora*, *Laguncularia*, *Avicennia* e *Conocarpus*. Além desses existem outros gêneros menos frequentes como *Hibiscus*, *Acrostichum* e *Spartina* (HERZ, 1991).

Os manguezais possuem importantes funções sócio-econômicas e ambientais como o fornecimento de uma grande variedade de madeira e produtos florestais não madeireiros, e a proteção costeira contra os efeitos do vento, ondas e correntes de água. Outras importantes funções são a ciclagem de carbono orgânico e de nutrientes nas águas costeiras, a conservação da diversidade biológica, incluindo mamíferos, répteis, anfíbios e aves, a proteção dos recifes de corais, a retenção de sedimentos, a função de filtro biológico e berçário para espécies típicas de peixes e mariscos (FAO, 2007; SPALDING; KAINUMA; COLLINS, 2010).

O ecossistema manguezal é de essencial importância na ecologia global, pois é através destes ambientes que passa a maior parte da matéria orgânica originada da decomposição continental em direção aos oceanos, como restos de folhas, excrementos de animais e sais minerais. Toda a matéria orgânica em manguezais que não é exportada pelas marés permanece no sedimento e é degradada ou modificada quimicamente por micro-organismos através de processo aeróbicos e anaeróbicos (KRISTENSEN; DITTMAR; MARCHAND, 2008; YONG *et al.*, 2011). O caráter anóxico dos sedimentos de manguezais é decorrente da granulometria fina e do rápido consumo da matéria orgânica, que se deposita superficialmente, por micro-organismos aeróbicos. A degradação aeróbica de materiais próximo a superfície do sedimento de manguezais geralmente ocorre de forma tão intensa que o oxigênio raramente consegue penetrar mais de 2 mm no sedimento (KRISTENSEN *et al.*, 1994; KRISTENSEN; DITTMAR; MARCHAND, 2008; SANTOS *et al.*, 2011a). A única

entrada de oxigênio no sedimento ocorre através das redes de raízes estreitas e tocas de caranguejo (KRISTENSEN; DITTMAR; MARCHAND, 2008). A fonte de carbono orgânico para os processos anaeróbicos no interior dos sedimentos de manguezal são oriundas de detritos enterrados, da biomassa proveniente da decomposição de raízes subterrâneas mortas e da excreção de carbono orgânico dissolvido (KRISTENSEN; ALONGI, 2006; KRISTENSEN; DITTMAR; MARCHAND, 2008).

Embora os manguezais sejam ricos em matéria orgânica, geralmente, existe uma deficiência de nitrogênio e fósforo (ALONGI, 2011). O interessante é que apesar destas limitações, esses ecossistemas são ambientes muito produtivos. Este paradoxo é explicado pelo eficiente sistema de ciclagem existente, onde o processo de reposição e geração de novos nutrientes através da decomposição de compostos orgânicos favorece a alta produtividade (HOLGUIN; BASHAN, 2001).

Os manguezais possuem uma rica diversidade microbiana e estes micro-organismos são essenciais para a manutenção da conservação, produtividade e recuperação desses ecossistemas. Estima-se que na biomassa microbiana total nos manguezais as bactérias, archaeas e fungos constituam 91%, enquanto microalgas e protozoários representam apenas 7 e 2%, respectivamente (ALONGI, 2002). Estes micro-organismos estão envolvidos nos processos de transformação de nutrientes, fotossíntese, fixação de nitrogênio, metanogênese, solubilização do fósforo, redução do sulfato e produção de metabólitos de interesse biotecnológico, tais como antibióticos, enzimas e biosurfactantes (DAS; LYLA; KHAN, 2006; DIAS *et al.*, 2009; HOLGUIN; BASHAN, 2001).

Apesar da grande importância ecológica e econômica dos manguezais, esses ambientes têm sido muitas vezes desvalorizados e vistos como ambientes insalubres e sem valor. A ocupação humana desordenada em regiões costeiras também tem contribuído para a degradação dos manguezais em algumas partes do mundo (FAO, 2007). Os impactos ambientais sobre os manguezais são oriundos do desmatamento para exploração de madeira, de aterros para dar lugar a portos e estradas, da agricultura, piscicultura e carcinicultura estuarinas, de atividades industriais, da poluição decorrente de derramamentos de petróleo, lançamentos de esgotos, lixos e agrotóxicos. Indiretamente, áreas também são perdidas por causa da construção de barragens de rios, que muitas vezes desvia a corrente de água e modifica a entrada de sedimentos, nutrientes e água doce (FAO, 2007; LEE *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2011a; SPALDING; KAINUMA; COLLINS, 2010).

Os desastres naturais também devem ser listados entre as possíveis causas de degradação. Vários países tropicais são frequentemente atingidos por ciclones, tufões e ventos fortes que podem danificar e/ou arrancar as árvores durante estas catástrofes (FAO, 2007). Todos esses impactos fazem com que esse ecossistema seja considerado ameaçado de desaparecimento (LEE *et al.*, 2006).

No Brasil, os manguezais são considerados como “Área de Preservação Permanente” - APP e protegidos pela legislação nacional. Esse ecossistema está incluído em diversos dispositivos constitucionais (Constituição Federal de 1988, art. 225) e infra-constitucionais (Lei nº 6.938/81 – Lei da Política Nacional do Meio Ambiente; Lei nº 4.771/65 – Código Florestal; Lei nº 6.766/79 - Lei de Parcelamento do Solo; Lei Federal nº 9.605/98 – Lei de Crimes Ambientais; Lei Federal Nº 7.661/98 - Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro; CONAMA nº 04/1985).

Ao longo dos últimos anos de constante degradação, a consciência da importância e do valor dos manguezais tem crescido e levado à preparação e/ou implementação de novas legislações que visam uma melhor proteção e gestão desses recursos ambientais. Muitos governos estão reconhecendo a importância dos manguezais para pesca, silvicultura, proteção do litoral e da vida selvagem. Apesar destes sinais positivos, ainda há muito a ser feito em relação a novos métodos de conservação, proteção e recuperação para efetivamente conservar este vital ecossistema (FAO, 2007; SPALDING; KAINUMA; COLLINS, 2010).

2.2 CONTAMINAÇÃO DE MANGUEZAIS POR PETRÓLEO

Os hidrocarbonetos do petróleo são os maiores poluidores de ambientes marinhos. As contaminações de ecossistemas por hidrocarbonetos é resultado das atividades relacionadas à extração, ao transporte, ao refino, à transformação e a utilização do petróleo e seus derivados. O crescimento da indústria do petróleo tem ocasionado um rápido aumento no número de acidentes envolvendo derrames de óleo nas regiões costeiras e estuarinas (GENTILI *et al.*, 2006). Um exemplo recente foi o derrame no golfo do México considerado o maior acidente registrado envolvendo derrame de petróleo no meio ambiente e que impactou os ecossistemas da região e a economia de diversos países (MASCARELLI, 2010).

A maioria dos óleos de derramamentos oceânicos converge sobre os ecossistemas costeiros como manguezais, que funcionam como um reservatório devido à alta capacidade de retenção de poluentes dos seus sedimentos. Essa deposição é favorecida pelo regime de marés e ocorre no sedimento e sistema de raízes aéreas (DUKE *et al.* 2000; SANTOS *et al.*, 2011a).

Essa retenção de poluentes intensifica a toxicidade proveniente dos contaminantes nesse importante ecossistema, considerado entre aqueles com o maior índice de sensibilidade ambiental aos derrames de óleo (SANTOS *et al.*, 2011a).

Em geral nos acidentes com derramamento de óleo onde a quantidade de contaminantes é alta o suficiente para ocasionar a morte das árvores e comprometer as comunidades de micro-organismos, torna-se necessário a remoção do sedimento contaminado para diminuir a fonte de contaminação. Já em situações onde não ocorre mortalidade de árvores, o ambiente pode se recuperar naturalmente. Em muitos casos a degradação do óleo no sedimento é severamente retardada e a melhor estratégia é intervir com processo de remediação para acelerar o tempo de recuperação (BURNS; CODI, 1998; SANTOS *et al.*, 2011a). Em tais situações, a recuperação pode levar um tempo extremamente longo ou o dano pode ser permanente (BRITO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2011a).

Dentre os contaminantes ambientais, os presentes no petróleo são os mais prejudiciais aos ecossistemas de manguezais (SANTOS *et al.*, 2011a). O petróleo é constituído por uma mistura complexa de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, por compostos não hidrocarbônicos, por outros componentes orgânicos e por alguns constituintes organometálicos, especialmente complexos de vanádio e níquel. Sua composição varia em função da localização geográfica e das condições físicas, químicas e biológicas que o originaram (CRAPEZ *et al.*, 2002, TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010). Alguns desses contaminantes são biodegradáveis, mas muitos são recalcitrantes e nocivos aos organismos vivos por serem lipossolúveis na membrana celular, prontamente absorvidos, e altamente mutagênicos e carcinogênicos (HAMDI *et al.*, 2007).

Os efeitos tóxicos dos contaminantes nos organismos vivos residentes nos manguezais podem ser agudos, que causam morte, e/ou crônicos, que reduzem o crescimento de organismos sobreviventes. A contaminação crônica causa efeitos adversos para as plantas, animais e comunidades de micro-organismos que podem persistir por um longo tempo. Esses danos ambientais estão relacionados ao tipo, quantidade e toxicidade dos poluentes, a condições climáticas, ao padrão de deposição e ao tempo de retenção (DUKE *et al.* 2000; SANTOS *et al.*, 2011a).

Dentre os manguezais brasileiros impactados com petróleo, destaca-se o manguezal da Baía de Todos-os-Santos, na Bahia. A face dessa baía voltada para o mar tem cerca de 450 km e é recoberta por um extenso manguezal (CELINO; QUEIROZ, 2006). Nesta região foram implantadas as primeiras unidades de exploração, produção e refino de petróleo em território brasileiro na década de 50. Como consequência desse pioneirismo, a biota deste

manguezal sofre fortes agressões decorrentes da introdução nesse ecossistema de diferentes tipos de petróleo e derivados, oriundos de derrames acidentais, do tráfego de navios e de 50 anos de exposição à indústria do petróleo. Como consequência essa região da Baía de Todos-Santos é considerada cronicamente contaminada (CELINO; QUEIROZ, 2006). Situação que é agravada pelo alto nível de ocupação territorial e pelos lançamentos de esgotos e efluentes domésticos e industriais.

2.3 DIVERSIDADE MICROBIANA E BIODEGRADAÇÃO

Os micro-organismos estão diretamente envolvidos nos ciclos biogeoquímicos, onde desempenham funções cruciais no funcionamento e manutenção dos ecossistemas. Eles são essenciais para a sobrevivência das formas de vida na Terra (HAMMOND, 1998).

O conhecimento sobre a diversidade microbiana e potencial metabólico dos micro-organismos de sedimentos de manguezais ainda é escasso comparado a outros ecossistemas do planeta. Uma descrição mais completa da diversidade microbiana e sua distribuição em áreas de manguezal contribuiriam para uma melhor compreensão das interações ecológicas encontradas nestes ambientes, bem como revelaria uma valiosa fonte de recursos biotecnológicos a serem explorados (DIAS *et al.*, 2009; KATHIRESAN; QASIM, 2005).

Os micro-organismos possuem uma alta diversidade e vasto potencial metabólico com genes e enzimas que possibilitam a degradação de muitos tipos diferentes de compostos orgânicos complexos em intermediários comuns de suas rotas metabólicas. As taxas e a extensão da biodegradação podem ser altamente variáveis e dependem do tipo de estrutura da comunidade microbiana e das condições ambientais prevalentes. A capacidade dos micro-organismos de degradar e reciclar poluentes ambientais representa a mais importante via de atenuação desses contaminantes (ALVAREZ; ILLMAN, 2006).

O petróleo contém hidrocarbonetos que variam de moléculas simples a complexas, que diferem em sua susceptibilidade ao ataque microbiano. De todos os hidrocarbonetos que constituem o petróleo cerca de 60 a 90% são biodegradáveis restando uma porção de 10 a 40% de moléculas recalcitrantes (CRÁPEZ *et al.*, 2002; TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010). No processo de degradação dos hidrocarbonetos os micro-organismos dão preferência àqueles de fácil digestão. Inicialmente, são degradados os alcanos e alcenos, seguido pelos hidrocarbonetos aromáticos, cicloalcanos e poliaromáticos (BAMFORTH; SINGLETON, 2005). Logo, as áreas contaminadas por um longo período

possuem uma reduzida porção de hidrocarbonetos alifáticos e uma maior parcela de hidrocarbonetos aromáticos. É importante ressaltar que as moléculas de difícil degradação, mesmo representando uma parcela pequena do petróleo, são liberadas em toneladas no meio ambiente. Esses poluentes impactam os ecossistemas e são bioacumulados e biomagnificados nas cadeias tróficas. Por esses motivos, existe um interesse crescente no desenvolvimento de métodos mais eficientes de remoção de contaminantes recalcitrantes no meio ambiente (CRÁPEZ *et al.*, 2002; TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são considerados compostos poluentes de prioridade ambiental a serem monitorados devido aos efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos, além de sua toxicidade aos seres vivos (SANTOS *et al.*, 2011a; SILVA; AZEVEDO; NETO, 2007; TAM *et al.*, 2001).

A Agência de Proteção Ambiental (“Environmental Protection Agency” - EPA) dos Estados Unidos lista como prioritários 16 HPAs em função de sua importância industrial, ambiental e toxicológica. Os HPAs prioritários são: acenaftaleno, acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno (1,2,3-c,d) pireno, naftaleno e pireno.

A solubilidade desses compostos em água é geralmente baixa e decresce em relação ao aumento do peso molecular. Existe uma relação diretamente proporcional do aumento no número de anéis com a estabilidade química e a hidrofobicidade das moléculas de HPAs, que as tornam menos susceptíveis aos processos de biodegradação por envolverem complexos mecanismos sequenciais de abertura de anéis aromáticos (YU *et al.*, 2005). Logo, os compostos de alto peso molecular são considerados mais recalcitrantes (SEO; KEUM; LI, 2009, ZHOU *et al.*, 2008).

Nos ecossistemas existem vários destinos para os HPAs como volatilização, foto-oxidação, oxidação química, bioacumulação, absorção em partículas do solo e lixiviação. Acredita-se que o modo mais eficiente para remoção desses contaminantes no meio ambiente é o processo de degradação microbiana (MROZIK; PIOTROWSKA-SEGET, 2010; SEO; KEUM; LI, 2009). A metabolização pode ser realizada por diferentes vias microbianas de degradação aeróbicas ou anaeróbicas, como mostrado na Figura 2.3.

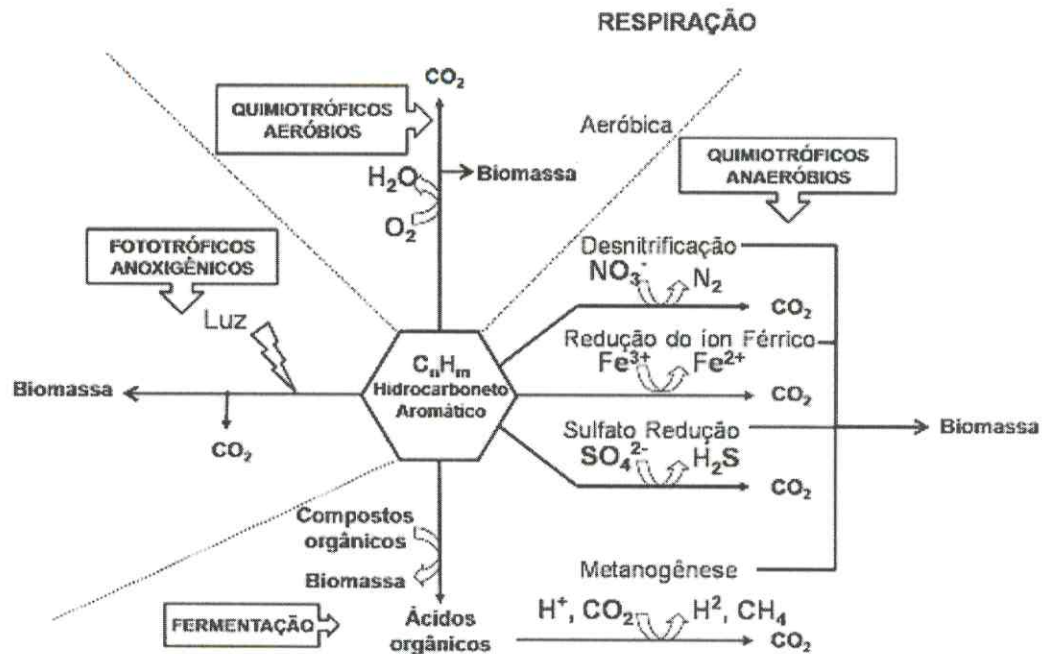


Figura 2.3- Rotas microbianas aeróbicas e anaeróbicas de utilização de compostos aromáticos. Fonte: TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010.

A degradação aeróbica de HPAs ocorre com uma maior eficiência energética por unidade de substrato, devido à oxidação completa do carbono em gás carbônico e água (TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010). Nos processos anaeróbicos, que envolvem várias rotas de metabolização realizadas por uma grande variedade de micro-organismos anaeróbicos estritos ou facultativos, a degradação é realizada através da utilização de diferentes aceptores finais de elétrons como, por exemplo, nitratos, ferro (Fe (III)), sulfatos e dióxido de carbono (CO_2) (DÍAZ *et al.*, 2004; FOGHT, 2008; MECKENSTOCK, SAFINOWSKI, GRIEBLER, 2004).

Dentre os gêneros de bactérias e fungos descritos como degradadores de HPAs destacam-se os apresentados na Tabela 2.1 (AL-TURKI, 2009). É importante ressaltar que os micro-organismos com capacidade de metabolizar HPAs são encontrados em pequeno número no meio ambiente, com as populações maiores e mais ativas presentes nos locais com histórico de contaminação por petróleo devido aos processos de adaptação e seleção (JACQUES *et al.*, 2007).

Tabela 2.1- Lista de alguns gêneros de bactérias e fungos degradadores de HPAs.

Fonte: AL-TURKI, 2009.

Bactérias						
<i>Achromobacter</i>	<i>Acidovorax</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Aerobacter</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Agmenellum</i>
<i>Agrobacterium</i>	<i>Alteromonas</i>	<i>Anabaena</i>	<i>Aphanocapsa</i>	<i>Arhrobacter</i>	<i>Aureobacterium</i>	<i>Azospirillum</i>
<i>Azotobacter</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Beijerinckia</i>	<i>Beneckea</i>	<i>Brevibacterium</i>	<i>Clavibacter</i>	<i>Clostridium</i>
<i>Coccochloris</i>	<i>Comamonas</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Curtobacterium</i>	<i>Cycloclasticus</i>	<i>Cytophaga</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Erwinia</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Gordonia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Leucothrix</i>
<i>Marinobacter</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Microcoleus</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Nostoc</i>
<i>Oscillatoria</i>	<i>Peptococcus</i>	<i>Phorm</i>	<i>Proteus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Sarcina</i>
<i>Serratia</i>	<i>Spherotillus</i>	<i>Sphingomonas</i>	<i>Spirillum</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Thermoleophilum</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Xanthomonas</i>						
Fungos						
<i>Absidia</i>	<i>Acremonium</i>	<i>Allescheria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aerobasidium</i>	<i>Basidiobolus</i>	<i>Bjerkandera</i>
<i>Botrytis</i>	<i>Candida</i>	<i>Cephalosporium</i>	<i>Choanephora</i>	<i>Circinella</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Claviceps</i>
<i>Cokeromyces</i>	<i>Conidiobolus</i>	<i>Corioloopsis</i>	<i>Corollospora</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Cunninghamella</i>	<i>Debaromyces</i>
<i>Dendryphiella</i>	<i>Emericellopsis</i>	<i>Epicoccum</i>	<i>Eupenicillium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Gilbertella</i>	<i>Gliocladium</i>
<i>Gonytrichum</i>	<i>Mucor</i>	<i>Neurospora</i>	<i>Oidiodendrum</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>Panaeolus</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Peronospora</i>	<i>Pestalotia</i>	<i>Phanerochaete</i>	<i>Phyctochytrium</i>	<i>Phycomyces</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Pichia</i>
<i>Pleurotus</i>	<i>Psilocybe</i>	<i>Ramaria</i>	<i>Rhizophlyctis</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomycopsis</i>
<i>Saprolegnia</i>	<i>Scedosporium</i>	<i>Scopulariopsis</i>	<i>Smittium</i>	<i>Sordaria</i>	<i>Sporobolomyces</i>	<i>Syncephalastrum</i>
<i>Talaromyces</i>	<i>Tetracoccosporium</i>	<i>Thamnidium</i>	<i>Torulopsis</i>	<i>Trametes</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichosporon</i>

A diversidade de rotas microbianas para degradar compostos orgânicos e a variabilidade de condições específicas de locais contaminados torna difícil prever a velocidade e a extensão no qual diferentes poluentes podem ser degradados em diferentes ambientes. Esta dificuldade muitas vezes invalida extrapolações de experiências relacionadas a processo de remediação de ambientes contaminados de um local para outro. No entanto, algumas generalizações podem ser realizadas em relação a fatores hidrogeológicos, químicos e biológicos que influenciam o sucesso da biodegradação e mecanismo de atenuação natural (ALVAREZ; ILLMAN, 2006).

2.4 BIORREMEDIAÇÃO

Embora a evaporação e a fotoxidação do petróleo desempenhem um importante papel na desintoxicação de ambientes contaminados, no final do processo a completa degradação é realizada por micro-organismos. Em casos de derramamentos onde ocorrem contaminações com alta concentração de poluentes, uma rápida desintoxicação é requerida para evitar que ocorram maiores danos aos ecossistemas naturais, não sendo muito apropriado aguardar uma resposta natural pela comunidade de micro-organismos autóctones (GENTILI *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de tecnologias para remover esses compostos tóxicos do petróleo tem recebido muita atenção nas últimas décadas devido aos derrames acidentais e vazamentos ocorridos em diversas regiões do mundo. Muitas tecnologias para descontaminação de ambientes poluídos baseiam-se na utilização de processos físicos e/ou químicos. A biorremediação utiliza organismos vivos, normalmente plantas ou micro-

organismos, para remoção ou redução de poluentes no ambiente. Essa tecnologia tem sido intensamente pesquisada e recomendada pela comunidade científica atual como alternativa mais viável, ambientalmente amigável e eficaz para o tratamento de ambientes contaminados com moléculas orgânicas de difícil degradação. Ao contrário dos processos físicos e/ou químicos, a biodegradação completa (mineralização) é capaz de eliminar os contaminantes no meio ambiente, tendo como produtos finais dióxido de carbono, água e biomassa microbiana (ALVAREZ; ILLMAN, 2006).

No Brasil, o uso de remediadores é permitido e visto como uma opção viável nas ações de recuperação de ecossistemas contaminados, no tratamento de resíduos e efluentes. Apesar de benéficos quando aplicados corretamente, os diferentes remediadores em função das peculiaridades e do uso inadequado podem acarretar desequilíbrios nos ecossistemas e/ou danos ao meio ambiente. Logo, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) em sua resolução nº 314, de 29 de outubro de 2002, determinou que os remediadores devem ser registrados junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) para fins de produção, importação, comercialização e utilização. De acordo com a definição dada por essa resolução, remediadores são produtos, constituídos ou não por microorganismos, destinados à recuperação de ambientes e ecossistemas contaminados, tratamento de efluentes e resíduos, desobstrução e limpeza de dutos e equipamentos, atuando como agente de processo físico, químico, biológico ou combinados entre si. Em 19 de maio de 2010, foi publicada a Instrução Normativa IBAMA nº 5, que estabelece os procedimentos e exigências a serem adotados para o efeito de registro, renovação de registro e anuência prévia para a realização de pesquisa e experimentação com produtos remediadores no Brasil.

Os processos de biorremediação podem ser efetuados *in situ*, em que não há necessidade de remoção do substrato contaminado e o processo de limpeza é realizado no próprio local poluído, ou *ex situ*, em que é necessário remover o substrato para proceder com o tratamento de descontaminação em instalações apropriadas fora do local contaminado (ALVAREZ; ILLMAN, 2006; JACQUES *et al.*, 2007; TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010). Estes dois métodos principais de biorremediação são significativamente diferentes em termos de controles experimentais e consistência de resultados, e apresentam vantagens e desvantagens. O processo *ex situ* apresenta taxas de biodegradação menos variáveis comparado ao processo de *in situ*, que é bem mais variável e de difícil previsão. Os procedimentos de biorremediação *ex situ* são independentes dos fatores ambientais que afetam de forma adversa a eficácia do processo. Além disso, como a biorremediação *ex situ* é realizada em ambientes não naturais, o processo pode ser manipulado facilmente por

tratamentos físico-químicos dos poluentes alvos antes e/ou durante a degradação. Esse procedimento de biorremediação é mais aplicado para a remediação de solo/sedimentos contaminados com altos níveis de compostos recalcitrantes, solos argilosos com baixa permeabilidade de poluentes, sítios contaminados em meio ambiente com condições não favoráveis para os processos biológicos e onde a liberação ambiental de micro-organismos não é viável por razões regulamentares (PANDEY; CHAUHAN; JAIN, 2009).

Apesar das vantagens citadas referentes aos métodos de biorremediação *ex situ*, esses tratamentos são em geral mais caros ou menos econômicos em comparação com as abordagens *in situ*, devido ao fato da necessidade de remoção e transporte do material contaminado, bem como as instalações especializadas para o desenvolvimento do processo.

A abordagem da biorremediação *in situ* constitui a tecnologia mais comumente utilizada no tratamento e restauração ecológica de ambientes contaminados, sendo muito aplicada em processos de descontaminação de solos e águas subterrâneas, principalmente em situações nas quais as escavações podem gerar impactos de maior magnitude do que a própria presença dos contaminantes, ou ainda, nos casos em que os riscos à saúde humana ou ecológica são gerenciáveis. Os tratamentos de biorremediação *in situ* não requerem que o solo ou amostra contaminada seja removido para locais específicos e, por isso, eles são frequentemente menos onerosos. Outra importante vantagem do processo de biorremediação *in situ* é sua aplicabilidade em diversos ambientes, por exemplo, instalações industriais, aquíferos, solos, subsolos, águas subterrâneas e até mesmo em ambientes extremos como na região ártica polar. Esta vasta aplicação é possível devido à distribuição ubíqua e a atividade dos micro-organismos proporcionarem uma opção de descontaminação eficaz até mesmo dos microambientes remotos, que são normalmente inacessíveis aos métodos de biorremediação *ex situ* (PANDEY; CHAUHAN; JAIN, 2009).

A avaliação comparativa das vantagens e desvantagens de processos de biorremediação *ex situ* e *in situ* pode constituir um estudo interessante, no entanto, para fins práticos, a seleção entre uma das abordagens acima é primariamente determinada pelas características físico-químicas do local contaminado, tipo e concentração dos contaminantes. As tecnologias de biorremediação devem ser aplicadas somente após um estudo detalhado da área impactada e racionalizadas segundo os resultados esperados do processo (PANDEY; CHAUHAN; JAIN, 2009).

A biorremediação natural é uma técnica realizada *in situ*, sendo conhecida como atenuação natural ou biorremediação passiva. Neste procedimento os poluentes são metabolizados no local por processos físicos, químicos e biológicos naturais, como

volatilização, diluição, sorção e biodegradação. Esse procedimento ocorre lentamente e exige o monitoramento do local por longos períodos de tempo (ALVAREZ; ILLMAN, 2006; JACQUES *et al.*, 2007, TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010).

O sistema de biopilhas, que é uma variação do processo de compostagem, é uma técnica *ex situ* muito utilizada no tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos. Os solos contaminados são removidos e colocados na forma de pilhas, visando à degradação dos contaminantes por micro-organismos aeróbicos. Para acelerar o processo de remediação pode ser realizada a adição de corretivos, fertilizantes, água, micro-organismos com conhecida capacidade degradativa, biossurfactantes para aumentar a biodisponibilidade de poluentes, etc. Esse processo ocorre em um local que permita o controle da lixiviação e do escoamento superficial dos líquidos originados dessas pilhas (JACQUES *et al.*, 2007, TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010).

A estratégia de *landfarming* também é utilizada para tratamento de solos contaminados, podendo ser realizado *in situ* ou *ex situ*. Nesse processo de biorremediação, os micro-organismos da camada superficial são estimulados a degradar os contaminantes e transformá-los em substâncias inertes. A estimulação para o processo de degradação consiste na aeração e homogeneização das camadas de solo com diferentes concentrações de contaminantes através do revolvimento por operações de aração e gradagem (JACQUES *et al.*, 2007, TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010).

A técnica de bioventilação baseia-se na introdução de oxigênio no substrato contaminado para estimular a atividade dos micro-organismos aeróbios. É normalmente utilizada para o tratamento de solos contaminados e pode ser aplicada em processos *in situ* ou *ex situ* (JACQUES *et al.*, 2007, TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010).

O tratamento em biorreatores consiste em um método *ex situ* de biorremediação eficiente para o tratamento de solos e sedimentos contaminados com poluentes recalcitrantes. Nesse processo, o material contaminado é tratado em reatores, sob condições ambientais controladas, utilizando agitação mecânica para aumentar a aeração, a homogeneidade dos poluentes e sua disponibilidade aos micro-organismos. No interior dos biorreatores, as condições ambientais, o valor de pH, a disponibilidade de nutrientes, a aeração e a temperatura são otimizadas para o máximo crescimento microbiano. Também é possível a inoculação de micro-organismos com comprovada atividade degradativa. A técnica possui a vantagem de degradar poluentes rapidamente. Por outro lado, essa técnica não permite o tratamento de grandes quantidades de materiais devido ao tamanho dos biorreatores e os custos operacionais (JACQUES *et al.*, 2007, TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010).

A fitorremediação baseia-se na utilização de plantas para remediar ambientes contaminados principalmente por metais pesados e compostos orgânicos, sendo muito aplicada na limpeza de ambientes contaminados com agrotóxicos, hidrocarbonetos, solventes orgânicos e combustíveis (JACQUES *et al.*, 2007, TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010).

A bioestimulação é uma estratégia que consiste na identificação e ajuste de fatores limitantes nos processos de biodegradação como a concentração de nutrientes essenciais, os valores de pH, oxigênio e atividade de água, etc. Esse procedimento de biorremediação é viável quando aplicado em ambientes contaminados que possuem uma microbiota com potencial metabólico para degradar contaminantes, podendo ser utilizado em processos *in situ* ou *ex situ*, sendo aplicado principalmente na forma *in situ* (NIKOLOPOULOU; KALOGERAKIS, 2009; TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010; TYAGI; FONSECA; CARVALHO, 2010).

A bioaugmentação baseia-se na adição de micro-organismos com desejada capacidade catabólica, autóctones ou alóctones, presentes em suficientes tipos, número e compatibilidade, que degradem ou favoreçam a degradação dos contaminantes de forma eficaz. Essa técnica é eficiente para degradar compostos químicos recalcitrantes e pode ser utilizada tanto *in situ* quanto *ex situ*, sendo principalmente aplicada em tratamentos *in situ*. A maioria das aplicações é realizada em ambientes onde não existe um número suficiente de micro-organismos para promover uma remediação natural ou que a população microbiana nativa não possua as rotas metabólicas necessárias para metabolizar os contaminantes (JACQUES *et al.*, 2007; TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010; TYAGI; FONSECA; CARVALHO, 2010).

As técnicas mais comuns de bioaugmentação utilizadas são a adição de culturas puras ou consórcios bacterianos pré-adaptadas, introdução de bactérias geneticamente modificadas, e adição de genes específicos inseridos em vetores para serem transferidos por conjugação dentro das comunidades microbianas autóctones (EL FANTROUSSI; AGATHOS, 2005; TYAGI; FONSECA; CARVALHO, 2010). As técnicas de bioaugmentação são realizadas geralmente com micro-organismos na forma livre, sendo que a aplicação de células microbianas imobilizadas em suportes poliméricos vem sendo bastante estudada e recomendada devido às vantagens obtidas durante o processo de biorremediação como a maior tolerância contra grandes concentrações de compostos tóxicos, a maior taxa de crescimento microbiano, a maior estabilidade catalítica, além das células poderem ser mantidas estáveis e ativas por um maior período (CHEN *et al.*, 2007; HSIEH *et al.*, 2008).

2.5 IMOBILIZAÇÃO

A imobilização é um processo de retenção de células ou moléculas em suportes poliméricos. Os principais métodos de imobilização são adsorção, ligação covalente, ligação cruzada, encapsulamento e aprisionamento (FIGURA 2.4) (BICKERSTAFF, 1997; CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006; MENDES *et al.*, 2011; WOODWARD, 1988).

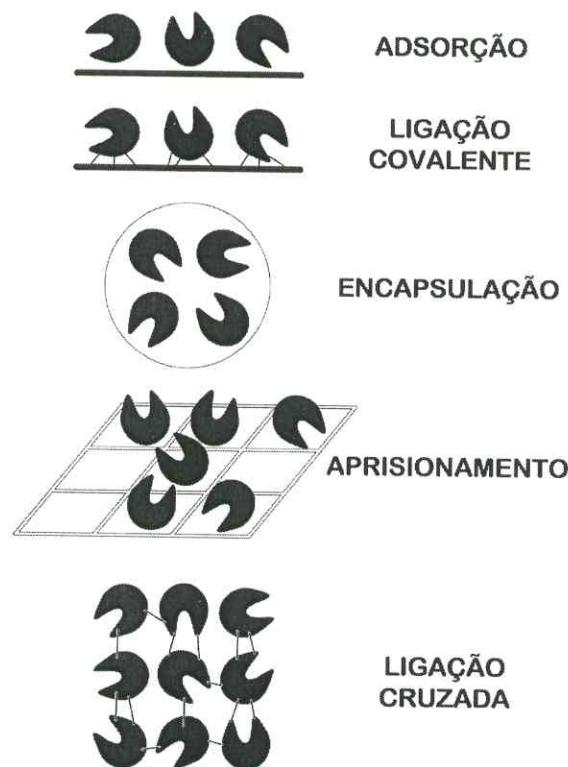


Figura 2.4- Principais métodos de imobilização. Fonte: Adaptado de Bickerstaff, 1997.

Dentre os métodos de imobilização, a adsorção é o método mais simples. Baseia-se em interações reversíveis de superfície entre células ou enzimas com o suporte polimérico. As forças de ligações envolvidas são fracas, em sua maioria eletrostática, Van der Waals, iônicas, interações por ligações de hidrogênio e hidrofóbicas. As principais vantagens deste processo de imobilização são a facilidade e a simplicidade, além da estrutura imobilizada ser pouco alterada. A grande desvantagem é a dessorção devido às variações de temperatura, pH e força iônica (BICKERSTAFF, 1997; CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006; MENDES *et al.*, 2011; SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012; WOODWARD, 1988).

No processo de imobilização por ligação covalente ocorre a ativação de suportes com a inserção de grupos reativos que reagem com os grupos nucleofílicos do material a ser imobilizado. Muitos fatores podem influenciar a seleção de um suporte particular e as pesquisas têm mostrado que a hidrofílicidade é o fator mais importante para manter a atividade de enzimas. Logo, polímeros de polissacarídeos muito hidrofílicos, como por exemplo, celulose, dextrana, agarose e amido, são bons suportes para a imobilização. Os resíduos de açúcares nestes polímeros contêm grupos hidroxil, que são funcionais nas ligações covalentes. Outros suportes como a sílica e os poros de vidro também são usados, entretanto, são menos hidrofílicos. As principais vantagens desse processo são a maior resistência em relação à variação de pH, temperatura e influência de solventes orgânicos, e o fato da carga de compostos imobilizados permanecer constante após a etapa de imobilização. A seleção das condições para a imobilização por ligação covalente é mais difícil que em outros métodos de ligação em suportes. É necessário conhecer a densidade dos grupos ativos por unidade de área do suporte e a sua geometria para reduzir a formação de complexo enzima-suporte inativo. Este método pode também afetar a estrutura ativa da enzima, devido à alteração do centro ativo (BICKERSTAFF, 1997; CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006; MENDES *et al.*, 2011; SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012; WOODWARD, 1988).

O processo de imobilização por ligações cruzadas envolve a ligação das células ou enzimas num complexo tridimensional que pode ser realizada por métodos químicos ou físicos. Essa metodologia não utiliza suportes. Métodos químicos normalmente são utilizados na formação de ligações entre as células e um reagente bi ou multi funcional, como o glutaraldeído e o tolueno di-isocianato. No entanto, a toxicidade dos reagentes usados é um fator limitante. A ligação cruzada de células é feita por meio de agentes flocculantes como, poliaminas, polietilenoaminas, sulfonatos de poliestireno e vários fosfatos. A ligação cruzada é raramente utilizada como método de imobilização devido a suas propriedades mecânicas e sua baixa estabilidade (BICKERSTAFF, 1997; CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006; MENDES *et al.*, 2011; SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012; WOODWARD, 1988).

A imobilização por encapsulamento é realizada pelo envolvimento de células e/ou enzimas em uma membrana semipermeável, sendo similar ao método de aprisionamento. Proteínas ou enzimas, que são moléculas grandes, não podem sair da cápsula, mas substratos e produtos pequenos podem passar livremente através da membrana semipermeável. Muitos materiais podem ser usados para construir uma microcápsula variando de 10-100 μm de diâmetro, por exemplo, nylon e nitrato de celulose. Este método tem sido utilizado devido a

vantagens como maior capacidade de contenção de células e prevenção da perda de material imobilizado para o meio exterior. O fato de não existir um núcleo gelificado faz com que as limitações de transferência de massa sejam reduzidas. Como desvantagens têm-se: a restrição de que os compostos imobilizados podem ser aplicados somente com substratos de baixa massa molecular, a possível inativação de enzimas durante o procedimento de imobilização, a alta concentração de enzima necessária para garantia do processo, e os possíveis efeitos de difusão de substratos e/ou produtos no interior da matriz porosa (BICKERSTAFF, 1997; CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006; MENDES *et al.*, 2011; SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012; WOODWARD, 1988).

Já o processo de imobilização por aprisionamento baseia-se na manutenção de células ou enzimas livres em matrizes porosas, como alginato, carragenana e quitosana, restritas numa estrutura de gel. A porosidade da matriz é controlada para avaliar se a estrutura é firme o bastante para conter células e/ou enzimas e ao mesmo tempo permitir o livre movimento de substrato e produto. Nessa metodologia os compostos imobilizados podem ser protegidos de variações de pH, temperatura, solventes orgânicos e/ou compostos inibidores presentes no meio externo. As principais desvantagens são o pequeno volume disponível para contenção das células imobilizadas, a perda de células para o meio externo e a instabilidade dos suportes normalmente utilizados, que limita a utilização dos agregados por longos períodos. Existem diferentes métodos de aprisionamento: gelificação ionotrópica de macromoléculas com cátions multivalentes (ex: quitosana); gelificação induzida pela temperatura (ex: agarose, gelatina); polimerização orgânica por reação química e fotoquímica (ex: poliacrilamida) e precipitação de solventes imiscíveis (ex: poliestireno) (BICKERSTAFF, 1997; CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006; MENDES *et al.*, 2011; SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012; WOODWARD, 1988).

De acordo com o exposto, os diferentes métodos de imobilização apresentam vantagens e desvantagens e mesmo que a estabilidade de componentes imobilizados não possa ser garantida em todos os casos, várias vantagens são comuns a todas as metodologias. Dentre as vantagens podemos citar o fato de o inóculo ficar retido no suporte, de existir uma maior pureza e rendimento de produtos, da estabilidade catalítica, do maior controle do processo e do fato das células e/ou enzimas poderem ser mantidas estáveis e ativas por um maior período de tempo, além da obtenção de resultados econômicos mais favoráveis (BICKERSTAFF, 1997; CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006; MENDES *et al.*, 2011; SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012 ; WOODWARD, 1988).

Dentre os processos de imobilização, o método de aprisionamento é uma das técnicas mais amplamente utilizadas (HSIEH *et al.*, 2008).

Os materiais utilizados como suporte de imobilização devem ser encontrados com facilidade e abundância, ter custo reduzido e facilidade de operação em grande escala, apresentar alta capacidade de retenção, não ser tóxico as células e ter resistência mecânica durante o processo operacional. Existem vários polímeros naturais utilizados como suporte de imobilização por aprisionamento como o alginato, a carragenana, a agarose, a quitina e a quitosana (GENTILI *et al.*, 2006).

A quitosana é um heteropolissacarídeo constituído predominantemente por resíduos de β -1,4-D-glucosamina com variados graus de resíduos N-acetilados, sendo obtida a partir da desacetilação alcalina (CRAVEIRO; CRAVEIRO; QUEIROZ, 2004; KURITA, 2006) ou enzimática (TSIGOS *et al.*, 2000) da quitina (FIGURA 2.5 e 2.6).



Figura 2.5- Aspecto da fibra de quitosana.

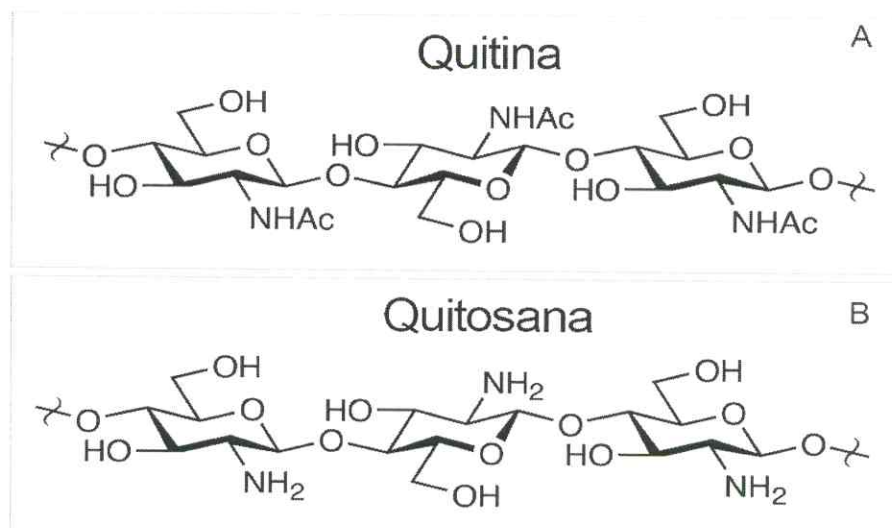


Figura 2.6- Estrutura química da quitina (A) e quitosana (B). Fonte: KURITA, 2006.

A quitosana é um dos polímeros mais promissores para uso em imobilização celular por ser biocompatível, biodegradável, não tóxica, fisiologicamente inerte e bastante disponível, sendo obtida a partir da quitina, um dos polímeros mais abundantes na natureza. Outra propriedade interessante da quitosana é o fato desse polímero ser solúvel em soluções de ácidos orgânicos formando um gel que pode ser manipulado para produzir diferentes biomateriais como esferas, filmes e membranas (CHEN *et al.*, 2007).

A quitina é um homopolissacarídeo linear composto por unidades de N-acetil-D-glucosamina (ou 2-acetoamido-2-deoxi-D-glicose) em ligações β (1,4) encontrada amplamente distribuída na natureza em vários táxons: Fungi, Algae, Protozoa, Cnidaria, Aschelminthes, Endoprocta, Bryozoa, Phoronida, Brachiopoda, Echiurida, Annelida, Mollusca, Onychophora, Arthropoda, Chaetognatha, Pogonophora e Tunicata (KURITA, 2006). As fontes mais acessíveis de quitina são os exoesqueletos dos artrópodes, em particular as carapaças de caranguejos, camarões e lagostas, que são descartes da atividade de indústrias à base de alimentos marinhos (CHEN *et al.*, 2007). Logo, a utilização da quitina para a produção de quitosana para uso em processo de biorremediação é uma alternativa ecologicamente correta e economicamente viável.

Uma das restrições que se impõe para a utilização da quitosana como suporte para imobilização de bactérias e fungos é sua atividade antimicrobiana e o fato de alguns micro-organismos serem capazes de degradar a quitosana (BENHABILES *et al.*, 2012; SOMASHEKAR; JOSEPH, 1995). Portanto, a imobilização em quitosana depende diretamente da seleção de micro-organismos resistentes à atividade antimicrobiana desse biopolímero e que não degradem esse tipo de matriz através da produção de quitosanase.

2.6 COMPOSTOS ATIVOS DE SUPERFÍCIE (*SURFACE ACTIVE COMPOUNDS - SACs*)

Os SACs são moléculas anfipáticas com atividade de superfície que podem ser obtidos por processos químicos (sintéticos) ou produzidas por micro-organismos. Esses compostos possuem natureza anfipática, ou seja, são constituídos de um grupamento hidrofílico (polar) e outro hidrofóbico (apolar). A porção polar pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não-iônica ou anfotérica, enquanto a porção apolar frequentemente é uma cadeia hidrocarbônica (MULLIGAN, 2005).

A definição da palavra surfactante é baseada na contração da frase em inglês que descreve *surface-active agents*, que significa literalmente agente de atividade superficial. Os SACs são normalmente classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana. As principais classes incluem glicolipídios, lipopeptídios, lipoproteínas, fosfolipídios, ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Esses compostos estão divididos em duas categorias, os de baixo peso molecular chamados de biossurfactantes, que podem reduzir eficientemente a tensão superficial e interfacial, e os de alto peso molecular, conhecidos como bioemulsificantes, que são polímeros anfífilos eficientes em estabilizar emulsões óleo em água, mas não em reduzir a tensão superficial e interfacial (BANAT *et al.*, 2010).

Essas moléculas são produzidas por uma grande variedade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos. As principais aplicações desses compostos são emulsificação, desemulsificação e dispersão. Os emulsificantes apresentam a capacidade de promover a interação entre dois líquidos com diferentes graus de polaridade (por exemplo: água e óleo) quando agitados, tornando-os miscíveis e dispersando-os em uma fase fragmentada (fase dispersa) dentro de uma fase contínua. Os desemulsificantes agem desestabilizando emulsões previamente formadas. Eles atuam aproximando as gotas de água, promovendo uma drenagem da fase contínua e produzindo uma diminuição da concentração de espécies tensoativas localizadas nas interfaces água/óleo. Esse efeito induz a união das gotas de água e promove a separação de óleo da água. Já os dispersantes atuam quebrando moléculas de óleo em pequenas frações que se dispersam na camada de água (SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007; VAN HAMME; SINGH; WARD, 2006).

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente, levaram à

procura por surfactantes naturais como alternativas aos produtos existentes. Comparados aos surfactantes industriais, os de origem microbiana apresentam algumas vantagens como serem mais específicos, possuírem melhor atividade superficial e interfacial, e maior tolerância a variações de temperatura, pH e força iônica, serem biodegradáveis, apresentarem baixa toxicidade, além de possuírem a vantagem de serem sintetizados a partir de substratos renováveis (MARCHANT; BANAT, 2012; NITSCHKE; PASTORE, 2002; SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007).

Essas biomoléculas têm sido amplamente utilizadas biotecnologicamente em processos de biorremediação em aplicações ambientais para emulsificar e dispersar hidrocarbonetos no meio ambiente, aumentando a biodisponibilidade e melhorando as taxas de biodegradação. Outras importantes aplicações dessas moléculas são na limpeza de reservatórios de óleos, na recuperação melhorada do petróleo (MEOR), nas aplicações terapêuticas, antibacteriana e antifúngica, na atividade antiviral e antitumoral, na agricultura em formulações de herbicidas e pesticidas, na utilização em produtos de higiene e cosméticos, e na indústria de alimentos, papel, têxtil e cerâmica (NITSCHKE; PASTORE, 2002; SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007).

2.7 TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS A ESTUDOS DE BIORREMEDIAÇÃO

O desenvolvimento de ferramentas de biologia molecular que permitem acessar de forma holística as informações genéticas de DNA extraído diretamente de amostras ambientais, conhecido como DNA metagenômico, vem revolucionando a ecologia microbiana. A metagenômica possibilita o acesso à real diversidade microbiana, conhecimento esse, até recentemente, limitado a uma pequena fração de micro-organismos cultivados acessados pelas metodologias tradicionais dependentes de cultivo (DANIEL, 2004; STENUIT *et al.*, 2008). Isso porque a maioria dos micro-organismos nos ambientes é viável, porém não cultivável. Estima-se que a utilização dos métodos tradicionais de cultivo abrange apenas 0,1-10% da comunidade microbiana ativa (WHITE; PINKART; RINGELBERG, 1997).

Na aplicação de qualquer técnica de biorremediação é fundamental o estudo e caracterização das comunidades microbianas e suas respostas aos poluentes. Esses estudos possibilitam o monitoramento e adoção de medidas de ajustes adequadas. Em acompanhamento de processos de biorremediação, a diminuição na concentração de

contaminantes e suas possíveis transformações são monitoradas por métodos químicos, como a cromatografia, ou através de biossensores. Já a diversidade, a dinâmica, as adaptações e os princípios ecológicos envolvidos dentro das comunidades microbianas podem ser desvendados por diferentes estratégias (ALVAREZ; ILLMAN, 2006; PANDEY; CHAUHAN; JAIN, 2009; STENUIT *et al.*, 2008). Os métodos experimentais utilizados podem ser divididos, basicamente, em dois grandes grupos de acordo com a abordagem empregada:

- Métodos baseados em isolamento e cultivo: o monitoramento é realizado utilizando-se protocolos convencionais de microbiologia. Baseia-se no isolamento dos micro-organismos da amostra ambiental, na inoculação em meios de cultivo seletivos e/ou não seletivos, e na avaliação dos resultados através do crescimento de colônias em placas de Petri ou em ensaios de diluição utilizando tubos múltiplos;
- Métodos independentes de cultivo: o monitoramento de linhagens microbianas e/ou de grupos microbianos específicos na amostra é realizado através da análise de células e/ou ácidos nucleicos extraídos da amostra, utilizando-se sondas moleculares para genes determinados ou da amplificação de genes por metodologias de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* -PCR).

Dependendo da estratégia de biorremediação utilizada, do tipo de amostra e do ambiente alvo, os métodos de cultivo podem ser facilmente empregados e fornecem informações adequadas para avaliação das populações de micro-organismos biodegradadores e dos aspectos gerais das populações microbianas. No caso de ambientes e estratégias de biorremediação onde populações microbianas altamente diversificadas são favorecidas (alta diversidade de espécies envolvidas no processo), onde existam fatores limitantes ao cultivo, como presença de compostos recalcitrantes altamente tóxicos ou amostras de difícil coleta e manipulação (subsolo, aquíferos profundos, resíduos industriais tóxicos), os métodos baseados em isolamento e cultivo não são adequados para o monitoramento. Nestes casos, o uso de métodos independentes de cultivo pode representar uma alternativa mais eficiente (ALVAREZ; ILLMAN, 2006; PANDEY; CHAUHAN; JAIN, 2009; STENUIT *et al.*, 2008).

Os métodos independentes de cultivo permitem a detecção e monitoramento tanto dos micro-organismos específicos, como de genes de degradação relacionados ao processo de biorremediação. Dentre os métodos mais utilizados para detecção específica de micro-

organismos e de genes podemos citar a hibridização *in situ* com sondas moleculares (FISH - *fluorescent in situ hybridization*), bibliotecas genômicas e metagenômicas, PCR em tempo real e microchips. Outras importantes técnicas são as de *fingerprints*, como o polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição terminal (T-RFLP) e a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis-DGGE*) (ALVAREZ; ILLMAN, 2006; PANDEY; CHAUHAN; JAIN, 2009; STENUIT *et al.*, 2008).

As técnicas de *fingerprinting* são amplamente utilizadas por permitirem, de forma rápida e sensível, caracterizar comunidades microbianas e acompanhar o aparecimento (ou desaparecimento) de micro-organismos importantes ou de genes em escala temporal frente a diversos parâmetros ambientais (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993). Então, quando genes específicos são amplificados, esses segmentos de DNA de todos os membros da comunidade microbiana podem ser separados por eletroforese para gerar perfis, como uma impressão digital, onde através da detecção de mudanças nessa impressão digital molecular pode-se acompanhar a evolução da estrutura da comunidade microbiana no espaço e no tempo (NAKATSU, 2007).

A técnica de DGGE é uma das técnicas de *fingerprint* mais amplamente utilizada em estudos de ecologia microbiana (FIGURA 2.7). No DGGE ocorre a separação de genes amplificados por eletroforese. O nome desta técnica é devido ao fato do gel de eletroforese conter um gradiente de desnaturação (formamida e ureia) que separa as duas fitas de DNA durante a corrida. Quando ocorre a separação parcial das fitas de DNA presas pelo grampo CG, a mobilidade da molécula é reduzida no gel. Diferentes segmentos de DNA de mesmo tamanho são separados e presos em diferentes posições. Esta mobilidade de fragmentos de DNA depende do conteúdo de pares de bases citosina (C) e guanina (G). Quanto maior teor de GC no fragmento de DNA maior a migração no gel. Um alto conteúdo GC promove uma maior resistência à desnaturação porque pares GC de nucleotídeos formam 3 pontes de hidrogênio. Fragmentos ricos em duplas ligações formados pelo par de nucleotídeos adenina (A) e timina (T) são mais fáceis de desnaturar e não migram tanto através do gel. A incorporação de um grampo de 40 pares de bases rico em citosina e guanina na extremidade 5' do iniciador é necessário para prevenir a separação completa das fitas de DNA e para promover uma resolução ótima necessária aos fragmentos presos no gel que são visualizados como bandas. Nessa técnica é possível realizar a retirada de bandas específicas para sequenciamento do segmento de DNA e obtenção de informação filogenética ou conhecimento de genes funcionais (NAKATSU, 2007).

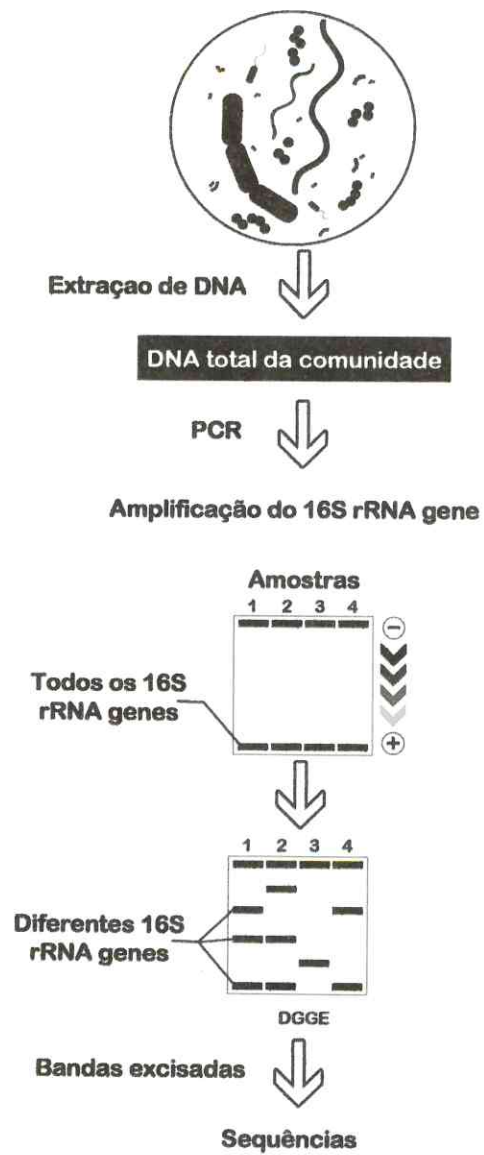


Figura 2.7- Esquema do DGGE. Fonte: Adaptado de ALVAREZ; ILLMAN, 2006.

3 OBJETIVO GERAL

Nesse trabalho objetivou-se o desenvolvimento de um produto biorremediador baseado na utilização de consórcios de bactérias hidrocarbonoclásticas e produtoras de SACs imobilizadas em esferas de quitosana para aplicação em sedimentos de manguezais contaminados por petróleo.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolamento de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos e produtoras de SACs através de técnicas de enriquecimento;
- Estudo da dinâmica das comunidades de bactérias por DGGE durante o processo de seleção dos isolados;
- Realização da caracterização fenotípica e identificação molecular das cepas isoladas;
- Avaliação da eficiência dos consórcios na produção de SACs com atividades emulsificantes e/ou desemulsificante;
- Avaliação e determinação das condições ideais para imobilização dos consórcios bacterianos em esferas de quitosana;
- Análise da microestrutura das esferas de quitosana com consórcios de bactérias através de MEV;
- Realização de ensaios e avaliação da aplicação do produto em processos de biorremediação *in situ*.

**4 CAPÍTULO 1. RIQUEZA DE BACTÉRIAS HIDROCARBONOCLÁSTICAS
E PRODUTORAS DE COMPOSTOS ATIVOS DE SUPERFÍCIE
RECUPERADA DE SEDIMENTOS DO MANGUEZAL DA BAÍA DE
TODOS-OS-SANTOS, BAHIA.**

4.1 INTRODUÇÃO

O crescimento da indústria do petróleo tem ocasionado um rápido aumento no número de acidentes envolvendo derrames de óleo nas regiões costeiras e estuarinas. Dentre os ambientes impactados estão os ecossistemas de manguezais, que são de extrema importância ecológica e econômica (DUKE *et al.*, 2000; FAO, 2007; SPALDING; KAINUMA; COLLINS, 2010). Como exemplo de manguezal impactado, temos a região da Baía de Todos-os-Santos, localizada no estado da Bahia, que representa a maior baía navegável do Brasil. A face dessa baía voltada para o mar tem cerca de 450 km e é recoberta por floresta de mangue. Na região nordeste da Baía de Todos-os-Santos foi implantado há aproximadamente 50 anos um pólo petroquímico, que no decorrer das décadas vem impactando o manguezal através de derramamentos acidentais de óleo (CELINO; QUEIROZ, 2006).

Atualmente, os procedimentos de biorremediação têm sido intensamente pesquisados e recomendados como alternativa viável, ecologicamente correta e eficaz no tratamento desses ambientes contaminados (ALEXANDER, 1999). Dentre as tecnologias de biorremediação, destaca-se a bioaugmentação, que consiste na aplicação de micro-organismos com determinada atividade metabólica, e a bioestimulação, que consiste na estimulação da microbiota já presente no ambiente contaminado (JACQUES *et al.*, 2007). Uma das limitações da bioaugmentação é a competição com a microbiota autóctone, a biodisponibilidade dos poluentes e sua toxicidade. Para superar essas limitações, várias pesquisas estão sendo desenvolvidas em busca de consórcios microbianos, por estes serem mais eficientes do que as culturas puras na degradação de poluentes do petróleo, devido à complementaridade metabólica entre os micro-organismos (JACQUES *et al.*, 2007; TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010). Além disso, buscam-se também micro-organismos que produzam compostos ativos de superfície (*Surface Active Compounds* - SACs), como biossurfactantes e bioemulsificante, que melhoram a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos e aumentam a eficiência dos processos catabólicos (BANAT *et al.*, 2010). Outro importante grupo de molécula com atividade de superfície de origem microbiana são os biodesemulsificantes, que encontram demanda nos processos de extração, transporte e refino do petróleo para retirar a água emulsificada no óleo e diminuição dos prejuízos ocasionados à indústria petrolífera por essas emulsões (ABDEL AZIM *et al.*, 2011).

Nesse sentido, a obtenção de consórcios microbianos com potencial de degradar hidrocarbonetos e produzir metabólitos de interesse biotecnológico, tais como enzimas e

SACs, consiste em uma relevante estratégia para desenvolvimento de produtos e processos de biorremediação. A rica diversidade de micro-organismos encontrada nos manguezais representa uma valiosa fonte de recursos biotecnológicos a ser explorada, assegura sua dinâmica e é essencial para o funcionamento dos ciclos biogeoquímicos e resiliência desse ecossistema (DAS; LYLA; KHAN, 2006; HOLGUIN; BASHAN, 2001). Portanto, essa diversidade microbiana pode ser manejada para a recuperação de manguezais impactados.

Nesse contexto, esse estudo teve por objetivos realizar o isolamento de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos e produtoras de SACs a partir do enriquecimento de sedimentos de manguezal da Baía de Todos-os-Santos, Bahia, Brasil, identificar as bactérias associadas a essas atividades, selecionar os isolados promissores e montar consórcios para uso em biorremediação.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Coleta e caracterização de sedimentos

Nesse estudo foram coletadas amostras de sedimentos de uma área do manguezal da Baía de Todos-os-Santos, cronicamente contaminada com óleo, próximo a Refinaria Landulpho-Alves-Mataripe. A área amostrada correspondeu a um quadrado com os vértices distando 4 a 5 metros. Foram realizadas 5 amostragens, uma em cada vértice do quadrado e uma central. Os sedimentos foram coletados com um ajuda de coletor cilíndrico de 30 cm de comprimento com 10 cm de diâmetro, durante a maré baixa. Um aparelho de posicionamento global (*Global Position System-GPS*) do modelo GPSMAP 76CSx, marca GARMIN, foi utilizado para determinar o local de amostragem. Os parâmetros ambientais pH e salinidade foram medidos *in situ* com uso de medidor de pH portátil modelo HANDYLAB, marca SCHOTT, e refratômetro portátil modelo S/MILL, marca ATAGO. No momento da coleta a camada mais superficial foi eliminada, sendo retirada a camada subsuperficial correspondente a 10 cm. As amostras foram assepticamente acondicionadas em recipientes estéreis, e mantidas em caixa refrigerada durante o transporte para o Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH), do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os sedimentos foram utilizados para o isolamento de consórcios bacterianos com potencial para degradação de hidrocarbonetos e produção de SACs. Os sedimentos foram caracterizados em relação à porcentagem de silte + argila e ao teor de matéria orgânica.

Para determinação do teor de matéria orgânica total (MOT) foram realizadas análises em triplicatas utilizando 0,5 g de sedimento seco previamente a 60 °C por 24 h. As amostras de sedimento foram pesadas em cadinhos secos, e, posteriormente, colocadas em mufla a 550 °C por 4 h para total combustão e determinação do peso residual. O cálculo da MOT foi realizado através da equação: $MOT (g/Kg) = [(Mi - Mf)/Mi] * 1000$, na qual MOT é a matéria orgânica total, Mf é a massa após a combustão e Mi a massa inicial (SCHULTE; HOPKINS, 1996).

Na análise granulométrica foi utilizada a metodologia de peneiramento descrita por Suguio (1973). As amostras de sedimento foram secas a 60 °C e fracionadas em três porções de 100 g. Cada porção foi utilizada no processo de peneiramento a úmido adicionando-se água ao material a ser peneirado para facilitar a passagem dos grãos finos, que possuem valores inferiores a 0,062 mm de diâmetro, visando à separação da fração lamosa da arenosa. A fração arenosa retida na peneira foi novamente seca a 60 °C e submetida ao peneiramento mecânico em um conjunto de 12 peneiras, onde se separam as classes arenosas e cascalhos (frações de 0,062 a 4,75 mm). As frações retidas em cada peneira foram secas e pesadas. Os dados foram analisados no programa de análise granulométrica ANASED 5j, desenvolvido pelo Laboratório de Geologia Marinha e Aplicada da UFC. Os percentuais de areia, silte e argila foram calculados utilizando-se a escala de Wentworth (1922).

4.2.2 Seleção de consórcios de bactérias hidrocarbonoclásticas

O isolamento de bactérias foi realizado pela técnica de enriquecimento semeando-se 10 g de sedimentos em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 90 mL de meio mineral Bushnell-Haas (BH) (BUSHNELL; HAAS, 1941), acrescido de 2% NaCl (m/v) (BH-salino). O meio BH contendo K₂HPO₄ (1,0 g); KH₂PO₄ (1,0 g); MgSO₄.7H₂O (0,2 g); CaCl₂. 2H₂O (0,026 g), (NH₄)₂.SO₄ (1,0 g) (Difco, Sparks, MD, EUA) por litro foi esterilizado a 110 °C por 10 min. O meio BH-salino foi suplementado com uma solução de micronutrientes 0,1% (v/v) contendo EDTA (2,5 g); ZnSO₄.7H₂O (10,95 g); FeSO₄.7H₂O (5,0 g); MnSO₄.H₂O (1,54 g); CuSO₄.5H₂O (0,392 g); Co (NO₃)₂.6H₂O (0,25 g); Na₂B₄O₇.10H₂O (0,177 g) por litro e esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm (Millipore, EUA).

Para a seleção de consórcios de bactérias capazes de degradar petróleo e derivados foram usadas quatro fontes de carbono: 1% (v/v) de hexadecano, 1% (v/v) querosene, 1% (v/v) de petróleo e uma mistura de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) composta de naftaleno (Naf), fenantreno (Fen) e pireno (Pir) em uma concentração final de 10 mg/L de

cada composto. As soluções de hexadecano, querosene e HPAs foram esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 µm (Millipore) e o petróleo por autoclavagem a 121 °C por 30 min. O petróleo utilizado no enriquecimento foi obtido do campo de Fazenda Belém da Unidade de Exploração e Produção do Rio Grande do Norte e Ceará (UN-RNCE).

Os meios receberam 10 g de sedimento e foram incubados sob agitação de 150 rpm a 30 °C por 15 dias. Subcultivos foram preparados transferindo 10% (v/v) das culturas para meios novos, de mesma composição, a cada 15 dias. Ao final do 45º dia de enriquecimento, as culturas foram diluídas seriadamente em solução de NaCl 0,9% (m/v) e semeadas em placas de Petri contendo Agar Triptona Glicose Extrato de Levedura (ATGE), acrescido de NaCl 2% (m/v) (ATGE-salino). As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h. As colônias de bactérias foram selecionadas pelas suas características morfológicas distintas e utilizadas para preparação de culturas puras e de consórcios através de subcultivo em novas placas com ATGE-salino. As cepas foram armazenadas em meio TGE contendo glicerol 20% (v/v) a -80 °C na coleção do LEMBIOTECH na UFC.

Amostras de sedimentos (T0) e das culturas de enriquecimento com HPAs foram usadas para monitoramento por DGGE da seleção de populações de bactérias. Para tanto, foram feitas extrações de DNA metagenômico nos tempos T0, T15, T30 e T45. As extrações foram feitas utilizando-se o kit *PowerSoil™ DNA Isolation* (Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

O DNA das cepas isoladas foi extraído utilizando-se o protocolo do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (WARNER, 1996). As concentrações e qualidades das extrações de DNA foram avaliadas em espectrofotômetro *Nanodrop®* ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE, EUA).

4.2.3 Análise do enriquecimento por Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

O enriquecimento utilizando a mistura de HPAs foi adotado como modelo de estudo para confirmar a eficiência do processo de enriquecimento no isolamento de consórcios bacterianos hidrocarbonoclásticos.

O DNA total de uma amostra composta dos sedimentos (T0), assim como os DNAs extraídos das culturas ao longo do enriquecimento (T15, T30, T45 dias) e dos isolados foram submetidos à amplificação da região hipervariável v3 do gene codificador do rRNA16S por reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction-PCR*) usando os iniciadores

GC-338F (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GGG GCA GCG CGG GGG ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') (LANE, 1991) e 518R (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 30 µL contendo 10 ng de DNA molde, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 3,0 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada iniciador e 1,0 unidade de Taq DNA polimerase (MBI Fermentas Inc., Amherst, New York, EUA). As amplificações foram realizadas em um termociclador (Eppendorf AG 22.331; Eppendorf, Hamburgo, GER) programado para uma etapa de desnaturação inicial (4 min a 94 °C), seguido por 35 ciclos de 1 min 94 °C, 1 min a 56 °C e 2 min a 72 °C. O último ciclo foi seguido por uma extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos das PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% (m/v) corado com SYBR® *Safe DNA* (Invitrogen, Eugene, OR, EUA).

As DGGEs foram feitas no sistema *D-code™ Universal Mutation Detection system* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Um volume de 10 µL de cada produto da PCR foi misturado com tampão de amostra na concentração 5:1 (PCR produto:tampão de amostra). Estas misturas foram aplicadas no gel de poliacrilamida 8% (m/v) com gradiente vertical de desnaturação uréia-formamida variando de 35% para 65%. A concentração 100% de desnaturação foi definida como ureia 7 M e 40% (v/v) de formamida (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993). A eletroforese foi realizada em uma tensão constante de 200 V por 4 h a uma temperatura de 60 °C. Os géis foram corados durante 1 h em 0,5 X TAE contendo 1 X do corante SYBR® *Green I* (Invitrogen, EUA) e fotografados sob iluminação UV. As análises das imagens foram realizadas no Software *BioNumerics* (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica), utilizando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*) e coeficiente de similaridade Jaccard.

4.2.4 Identificação molecular dos isolados bacterianos e análise filogenética

Os isolados foram identificados através do sequenciamento do gene condificador para o rRNA16S após amplificação usando os iniciadores 63F (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') e 1389R (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3') (MARCHESI *et al.*, 1998).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo 100 ng de DNA genômico, 20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada iniciador e 1,0 unidade de Taq DNA polimerase (MBI Fermentas

Inc., EUA). As PCRs foram feitas em termociclador programado para uma etapa de desnaturação inicial (4 min a 94 °C), seguido por 35 ciclos de 1 min 94 °C, 1 min a 55 °C e 2 min a 72 °C. O último ciclo foi seguido por uma extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos das amplificações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) corado com *SYBR® Safe DNA* (Invitrogen, EUA). Os produtos foram purificados usando o *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega Corporation, Madison, WI, USA). A concentração dos produtos purificados foi determinada medindo-se a absorbância a 260 nm (A260) em espectrofotômetro *Nanodrop® ND-1000*.

O sequenciamento de DNA foi realizado pela empresa Macrogen Inc., Seul, Coréia. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando os iniciadores 63F, 1389R, 518F (5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3 ') e 800R (5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3') e o kit *ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os produtos foram purificados por precipitação em etanol e solubilização em água destilada e aplicados no sequenciador ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As sequências parciais fornecidas pela empresa Macrogen Inc. foram de alta qualidade (Phred>20) e utilizadas para gerar sequências consenso usando o pacote *Phred/Phrap/Consed* (EWING; GREEN, 1998; EWING *et al.*, 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998). As sequências consenso obtidas foram analisadas e comparadas com outras depositadas no *GenBank*, usando o *Basic Local Alignment Search Tool – BLAST* (ALTSCHUL *et al.*, 1990) e no *The Ribosomal Database Project* (RDP) (MSU:<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>). Todas as sequências obtidas neste estudo foram depositadas no *GenBank*. O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado com o programa *ClustalW* (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) e utilizado para gerar uma árvore filogenética com o software MEGA, versão 4.0 (TAMURA *et al.*, 2007) a partir do algoritmo *Neighbor-Joining*. Foi utilizado teste de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985) com 1.000 reamostragens para avaliar os agrupamentos gerados.

4.2.5 Pesquisa de compostos ativos de superfície (SACs)

A pesquisa de SACs produzidos pelas cepas e consórcios bacterianos estudados foi feita através de ensaios de emulsificação utilizando querosene (IQBAL; KHALID; MALIK, 1995) e de desemulsificação utilizando *Tween 80*.

Cepas de bactérias isoladas e consórcios foram crescidos em caldo Triptona-Glicose-Extrato de Levedura (TGE) por 16 horas. Em seguida, as culturas foram ajustadas

para absorvância de 1,0 a 600 nm e inoculadas na proporção de 10% (v/v) em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio mineral com a seguinte composição por litro: K_2HPO_4 (13,9 g); KH_2PO_4 (2,7 g); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2 g); NaCl (1,0 g), $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ (0,026 g), $(NH_4)_2 \cdot SO_4$ (2,0 g) (Difco, Sparks, MD, EUA) e extrato de levedura (0,5 g), previamente esterilizado por filtração em membrana de 0,22 μm (Millipore, EUA). Esse meio mineral foi suplementado com a solução de micronutrientes na concentração de 0,1% (v/v) e de glicerol 3% (v/v) como fonte de carbono. As soluções de micronutrientes e de glicerol foram esterilizadas por filtração utilizando membranas de 0,22 μm (Millipore, EUA) e autoclavação a 121 °C por 15 minutos, respectivamente.

No meio de cultivo descrito foi utilizado uma relação carbono:nitrogênio de 30:1, visando uma maior produção de SACs (DARVISHI *et al.*, 2011). As culturas foram incubadas a 35 °C sob 150 rpm de agitação e o crescimento monitorado com 24, 48 e 72 h através de medidas de absorvâncias a 600 nm e determinação de pH. Nesses mesmos períodos, as culturas foram analisadas quanto à produção de emulsificantes e desemulsificantes.

Os ensaios de emulsificações foram realizados misturando-se em tubos de ensaio 2 mL da cultura bacteriana e 2 mL de querosene. Os tubos foram agitados por 2 min em *vortex* e deixados em repouso por 24 h. Após esse período foi calculado o percentual de emulsificação (E24), definido como a razão entre o volume da camada emulsificada e o volume total do ensaio (IQBAL; KHALID; MALIK, 1995). Como controle negativo foram realizadas ensaios com a mesma metodologia utilizando-se o meio mineral de crescimento e querosene.

Os ensaios de desemulsificação foram realizados através da observação da capacidade das culturas de desestabilizar emulsões água em óleo. Para obter as emulsões, foram adicionados 2 mL das culturas bacterianas, 2 mL de querosene e *Tween* 80 na concentração de 0,1% (v/v). Os tubos foram agitados por 2 minutos em *vortex* e deixados em repouso por um período de 24 h. Experimentos controles foram realizados com a mesma metodologia utilizando-se meio mineral, querosene e *Tween* 80. Em seguida, foi verificada a persistência total, parcial ou desemulsificação das emulsões. Foram considerados negativos os resultados de persistência total, e positivos os resultados nos quais houve diminuição das camadas de emulsão, tendo o controle como referência.

Todos os ensaios foram analisados em três experimentos independentes e em duplicatas. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo método de ANOVA com o pós-teste de *Tukey* utilizando intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Para as análises estatísticas foi utilizado o programa *GraphPad Prism* 5.0.

4.2.6 Análise das emulsões por microscopia

As emulsificações foram coletadas, transferidas para lâminas, coradas com rosa bengala e observadas por microscopia de campo claro e contraste de fase para caracterização.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Coleta e caracterização das amostras

As coletas de sedimentos de manguezais foram feitas em torno das coordenadas S 12°43'02.3" W 038°32'55.0", na região da Baía de Todos-os-Santos (FIGURA 4.1), em uma área visivelmente contaminada com borra oleosa (FIGURA 4.2).

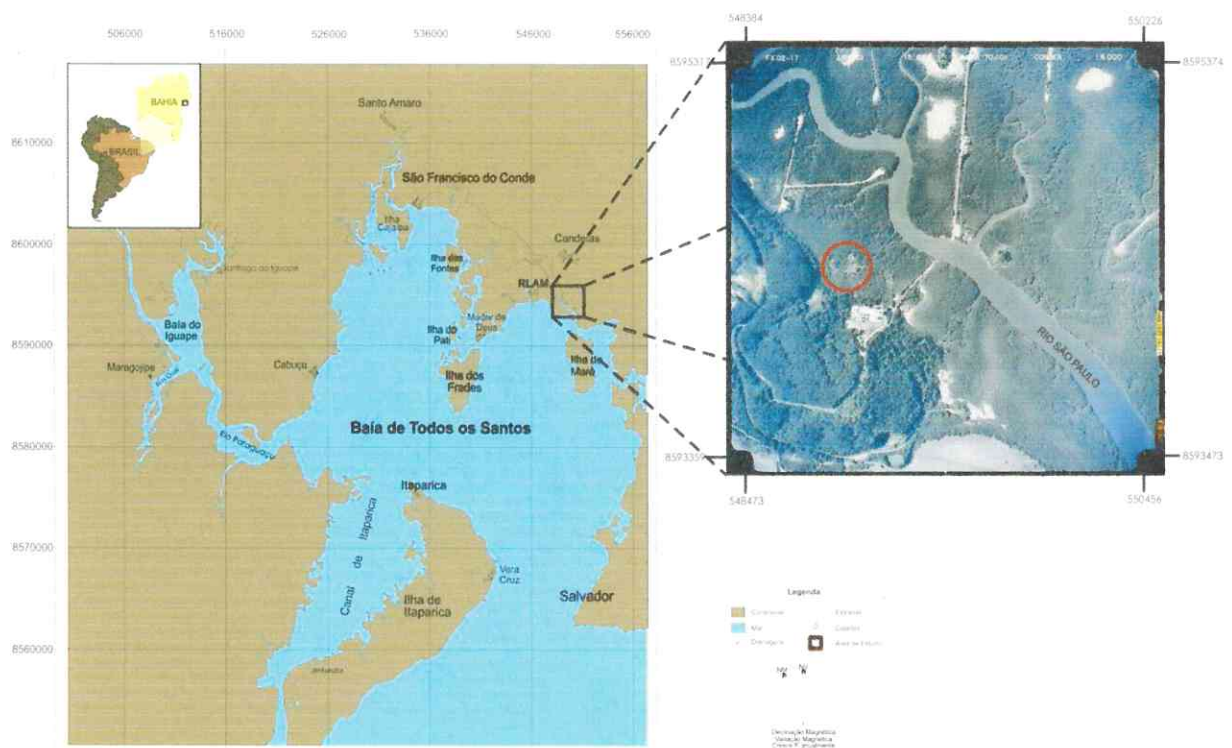


Figura 4.1- Área de coleta e ponto de amostragem evidenciado em vermelho.

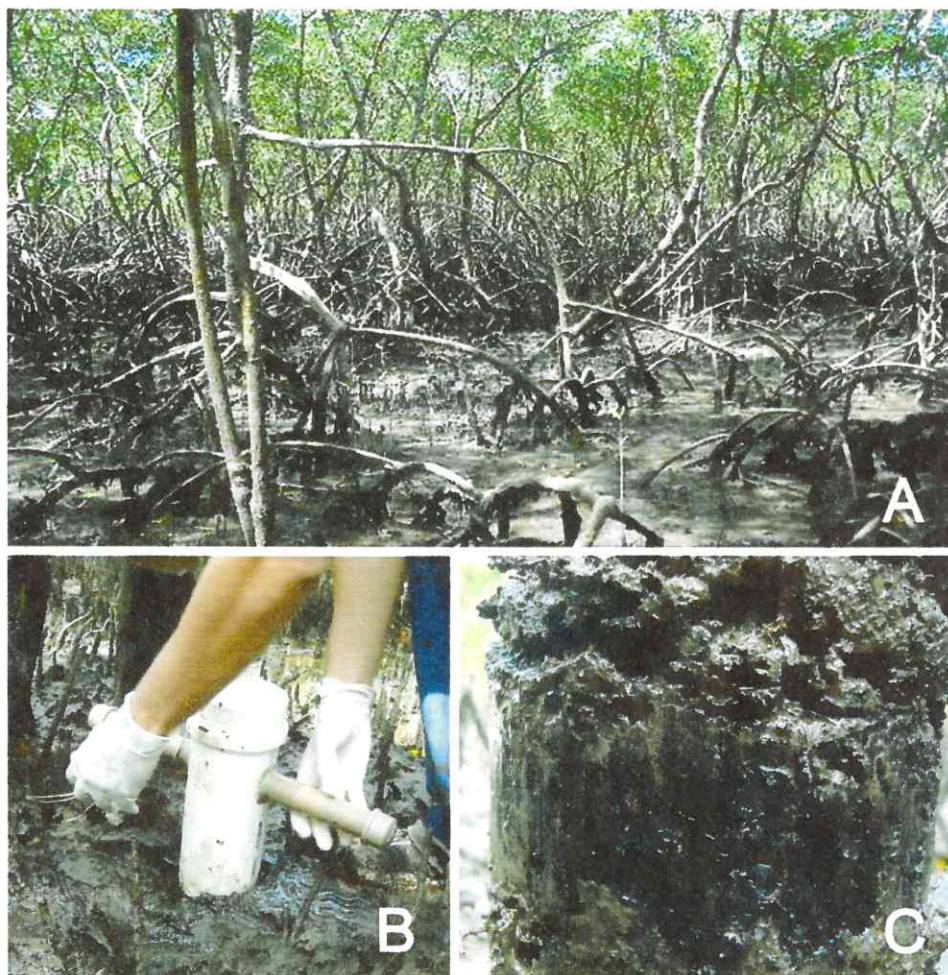


Figura 4.2- Aspecto do ecossistema manguezal no local de amostragem (A), coleta do sedimento com amostrador de PVC (B) e detalhe da contaminação oleosa no testemunho do sedimento (C).

É importante destacar que borras oleosas, como demonstrado na seção C da Figura 4.2, são encontradas distribuídas aleatoriamente em diferentes alturas nos 30 cm dos testemunhos de sedimento coletados neste manguezal.

As cinco amostras de sedimentos foram reunidas formando uma amostra composta que tinha as seguintes características: 24% de areia, 76% de silte + argila, 6,5% de matéria orgânica, pH 7,2 e salinidade 28.

4.3.2 Enriquecimento e isolamento de consórcios de bactérias hidrocarbonoclásticas

O enriquecimento de sedimentos de manguezal em meio mineral contendo hidrocarbonetos do petróleo como fonte de carbono levou, ao longo de 45 dias, a seleção de comunidades de bactérias distintas para cada uma das fontes de hidrocarbonetos. Os aspectos das culturas obtidas através de subcultivos em placas de ATGE-salino estão mostrados na Figura 4.3.

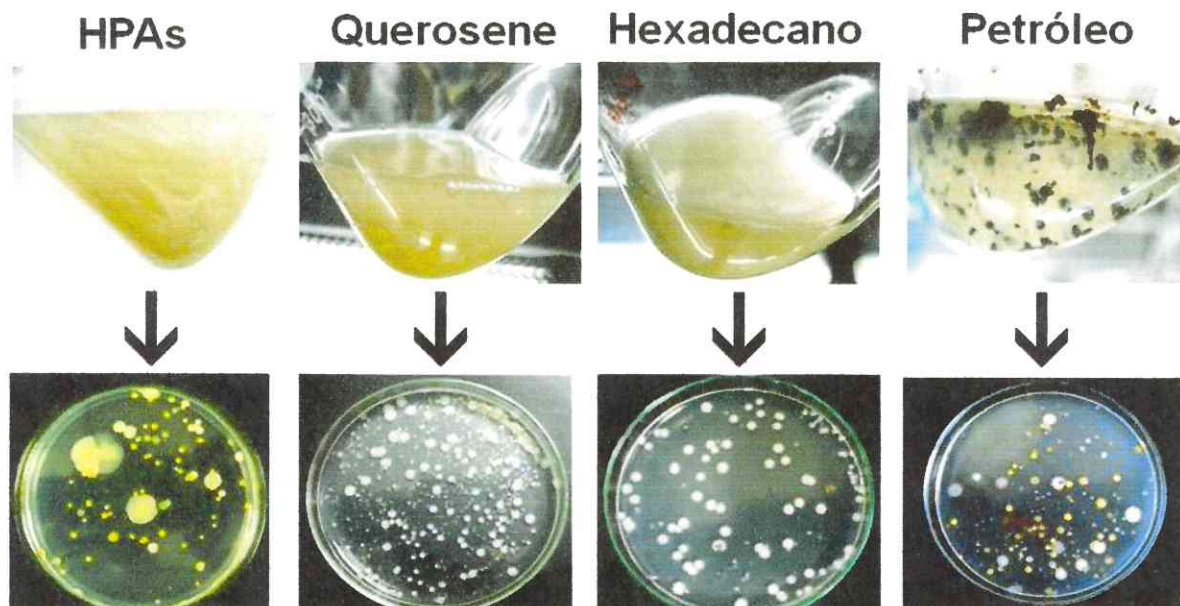


Figura 4.3- Aspecto das culturas de enriquecimento e dos subcultivos em placas de ATGE-salino após 45 dias.

Foram obtidos a partir dos enriquecimentos 4 diferentes consórcios: HPA, formado por 7 cepas de bactérias (HPABA1- HPABA7), Querosene, formado por 8 cepas (QUEBA1- QUEBA8), Hexadecano, formado por 7 cepas (HEXBA1- HEXBA7) e Petróleo, formado por 19 cepas (PETBA1-PETBA19). A pureza das culturas foi confirmada por quatro plaqueamentos sucessivos em ATGE-salino. Durante o processo de plaqueamento, 2 cepas do consórcio Petróleo (PETBA7 e PETBA18) não sobreviveram. Logo, no total restaram 39 cepas. As características morfológicas das colônias estão mostradas na Figura 4.4.

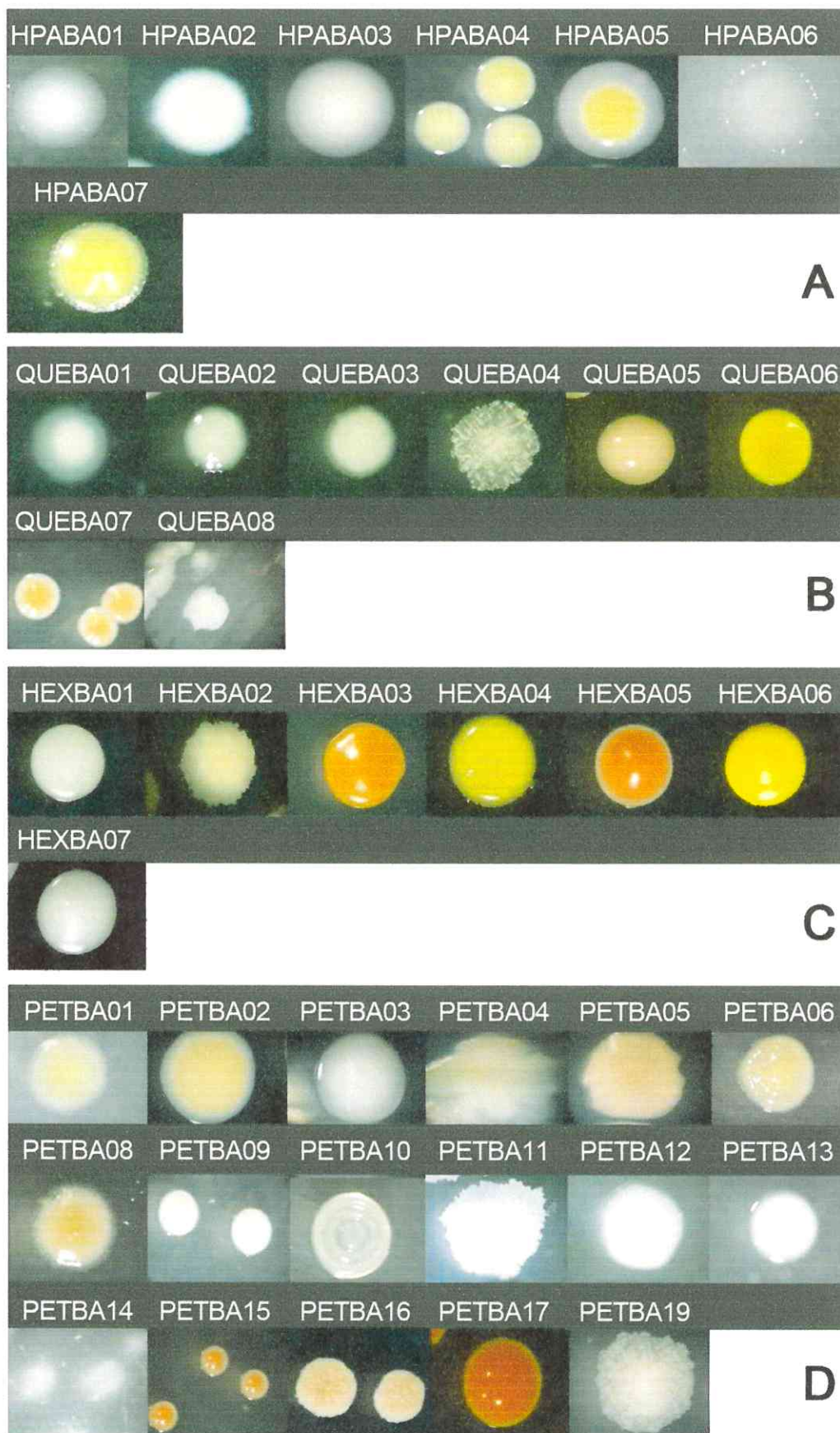


Figura 4.4- Morfologia colonial dos isolados obtidos nos diferentes enriquecimentos distribuídos por consórcios: HPA (A), Querosene (B), Hexadecano (C), Petróleo (D).

4.3.3 Monitoramento do enriquecimento com HPAs por DGGE

As mudanças nos perfis das comunidades bacterianas durante o processo de enriquecimento com uma mistura de três HPAs foram monitoradas por DGGE. A Figura 4.5 mostra o resultado da análise de agrupamento dos diferentes perfis ao longo do enriquecimento.

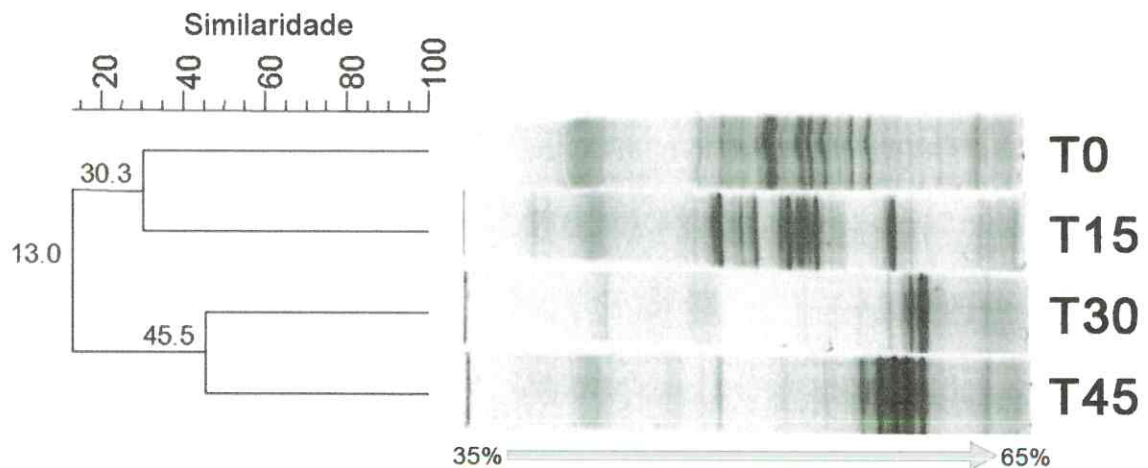


Figura 4.5- Análise de agrupamento dos perfis gerados por DGGE com gradiente de desnaturação 35-65% das comunidades nos diferentes períodos (T0, T15, T30, T45) do enriquecimento com HPAs.

A análise revelou um agrupamento formado pelas amostras de sedimentos (T0) e a cultura após 15 dias de enriquecimento (T15), demonstrando semelhança entre os perfis de unidades taxonômicas operacionais (UTOs). As culturas de 30 e 45 dias de enriquecimento agruparam juntas, compartilhando 45,5% de UTOs similares. A riqueza de UTOs foi reduzida do início para o final do processo de enriquecimento, passando de 25 UTOs para 11 (FIGURA 4.6). No período compreendido entre T15 e T30, o número de UTOs variou drasticamente de 18 para 5, o que evidencia o período no qual ocorreu a maior seleção de bactérias. Após 30 dias, as populações selecionadas cresceram e estimularam o surgimento de outros integrantes do consórcio, como demonstrado pelo aumento do número de UTOs de 5 para 11.

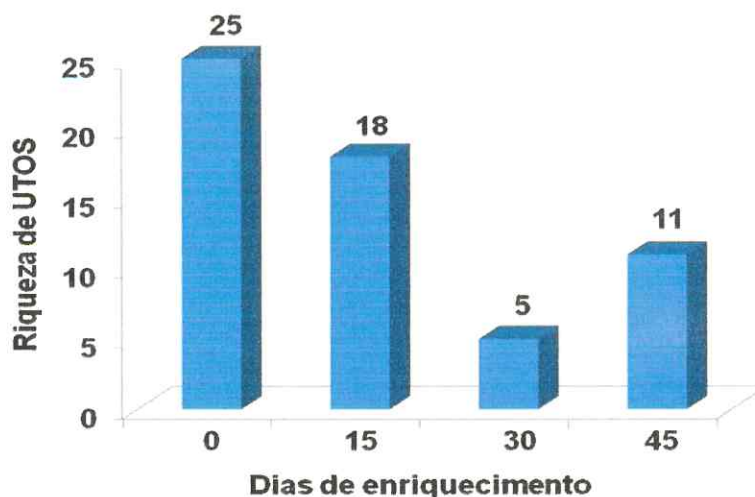


Figura 4.6- Variação do número de UTOs durante o processo de enriquecimento com HPAs.

A redução de UTOs ao longo do enriquecimento com HPAs, assim como as alterações na estrutura da comunidade, demonstra que o processo de enriquecimento promoveu a seleção das populações capazes de metabolizar a mistura de HPAs como fonte exclusiva de carbono e energia. Interessante destacar que a maioria das UTOs que aparecem no gel aos 45 dias de enriquecimento (T45) corresponde as UTOs das sete cepas isoladas (FIGURA 4.7).

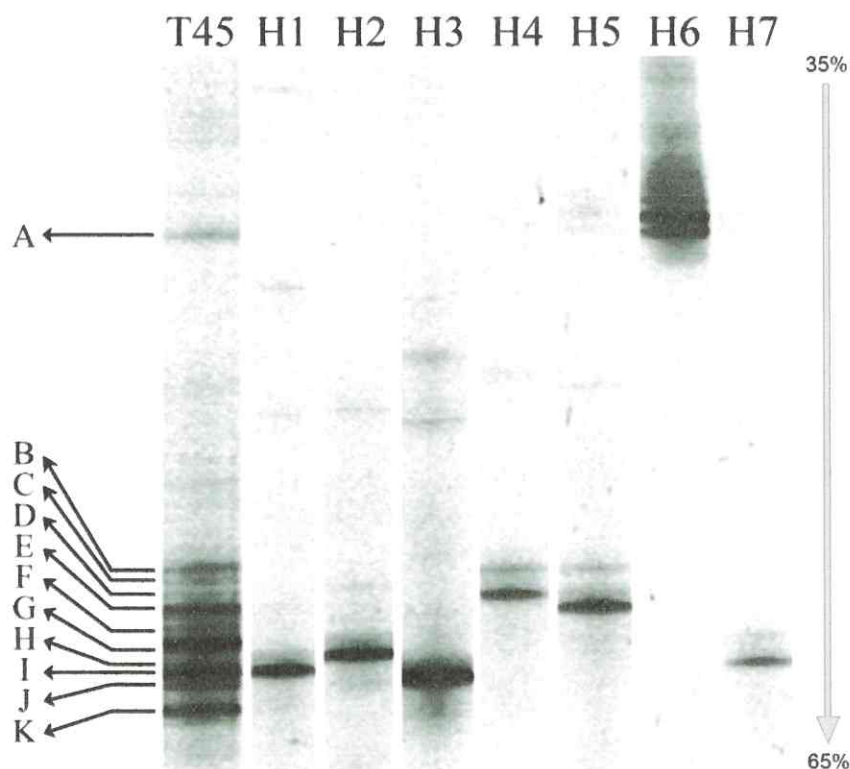


Figura 4.7- DGGE gerado com gradiente de desnaturação 35-65% evidenciando a correspondência de mobilidade de bandas dos 7 isolados (H1-H7) do consórcio HPAs com as UTOs presentes aos 45 dias de enriquecimento.

Todos os isolados apresentaram uma banda no gel, com exceção das cepas H4, H5 e H6, que apresentaram duas bandas. As cepas H1, H2, H3, H7 produziram bandas similares as bandas I, G, J, H, respectivamente. As bandas B e D correspondem às bandas da cepa H4 enquanto as bandas C e E encontram correspondência com as bandas da cepa H5. A cepa H6 produziu mais de uma banda no gel de DGGE e apenas uma dela apresentou mobilidade similar a UTO correspondente a letra A. As bandas F e K não encontraram correspondência com nenhum dos isolados, sugerindo que essas duas UTOs pertencem a bactérias não cultiváveis.

4.3.4 Identificação molecular dos consórcios bacterianos e análise filogenética

Foram identificadas 37 linhagens bacterianas dos 39 isolados obtidos após 45 dias de enriquecimento com as diferentes fontes de hidrocarbonetos. A identificação molecular foi feita com base na homologia de sequências do gene condificador para o rRNA16S com sequências depositadas em bancos de dados mundiais. As sequências obtidas neste estudo apresentaram tamanhos variando de 1148 até 1486 pares de base e percentuais de identidade acima de 98% com sequências depositadas no *GenBank* e 100% de certeza no banco de sequências do RDP, com exceção do isolado PETBA 01, cuja análise só permitiu a identificação em nível de Família. Todas as sequências foram depositadas no *GenBank* e suas identificações, tamanhos e números de acesso estão mostrados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1- Identificação molecular dos isolados bacterianos baseado nas sequências do gene codificador para o rRNA16S com seus respectivos números de acesso no GenBank e tamanhos em pares de base (pb).

Isolados Bacterianos	Identificação	Tamanho (pb)	Nº de acesso no <i>GenBank</i>
HPABA 1	<i>Ochrobactrum</i> sp.	1.254	HQ257211
HPABA 2	<i>Achromobacter</i> sp.	1.315	HQ257212
HPABA 3	<i>Ochrobactrum</i> sp.	1.293	HQ257213
HPABA 4	<i>Leifsonia</i> sp.	1.264	HQ257214
HPABA 5	<i>Curtobacterium</i> sp.	1.314	HQ257215
HPABA 6	<i>Staphylococcus</i> sp.	1.316	HQ257216
HPABA 7	<i>Micrococcus</i> sp.	1.310	HQ257217
QUEBA 1	<i>Achromobacter</i> sp.	1.469	JQ658398
QUEBA 2	<i>Mangroveibacter</i> sp.	1.438	JQ658399
QUEBA 3	<i>Mangroveibacter</i> sp.	1.443	JQ658400
QUEBA 4	<i>Gordonia</i> sp.	1.423	JQ658401
QUEBA 5	<i>Gordonia</i> sp.	1.458	JQ658402
QUEBA 6	<i>Micrococcus</i> sp.	1.469	JQ658403
QUEBA 7	<i>Paracoccus</i> sp.	1.413	JQ658404
QUEBA 8	<i>Achromobacter</i> sp.	1.472	JQ658405
PETBA 1	Xanthomonadaceae	1.481	JQ658406
PETBA 2	<i>Brachybacterium</i> sp.	1.455	JQ658407
PETBA 3	<i>Martelella</i> sp.	1.424	JQ658408
PETBA 4	<i>Cytophaga</i> sp.	1.432	JQ658409
PETBA 5	<i>Sphingomonas</i> sp.	1.421	JQ658410
PETBA 6	<i>Sphingopyxis</i> sp.	1.428	JQ658411
PETBA 8	<i>Bhargavaea</i> sp.	1.485	JQ658412
PETBA 9	<i>Mesorhizobium</i> sp.	1.382	JQ658413
PETBA 10	<i>Mesorhizobium</i> sp.	1.148	JQ658414
PETBA 11	<i>Gordonia</i> sp.	1.458	JQ658415
PETBA 12	<i>Thalassospira</i> sp.	1.433	JQ658416
PETBA 13	<i>Mesorhizobium</i> sp.	1.424	JQ658417
PETBA 14	<i>Pseudomonas</i> sp.	1.467	JQ658418
PETBA 15	<i>Gordonia</i> sp.	1.455	JQ658419
PETBA 16	<i>Gordonia</i> sp.	1.445	JQ658420
PETBA 17	<i>Dietzia</i> sp.	1.486	JQ818205
PETBA 19	<i>Gordonia</i> sp.	1.456	JQ658421
HEXBA 1	<i>Sphingomonas</i> sp.	1.232	JQ818204
HEXBA 2	<i>Gordonia</i> sp.	1.302	JQ658422
HEXBA 4	<i>Micrococcus</i> sp.	1.425	JQ658423
HEXBA 5	<i>Gordonia</i> sp.	1.448	JQ658424
HEXBA 6	<i>Micrococcus</i> sp.	1.438	JQ658425

Dos 37 isolados identificados, 17 foram classificados como Proteobacteria, 16 mostraram homologia com representantes do filo Actinobacteria, 1 foi afiliado ao filo Bacteroidetes e 2 ao filo Firmicutes. A classe mais abundante do filo Proteobacteria foi Alphaproteobacteria, seguida por Gammaproteobacteria e Betaproteobacteria (FIGURA 4.8).

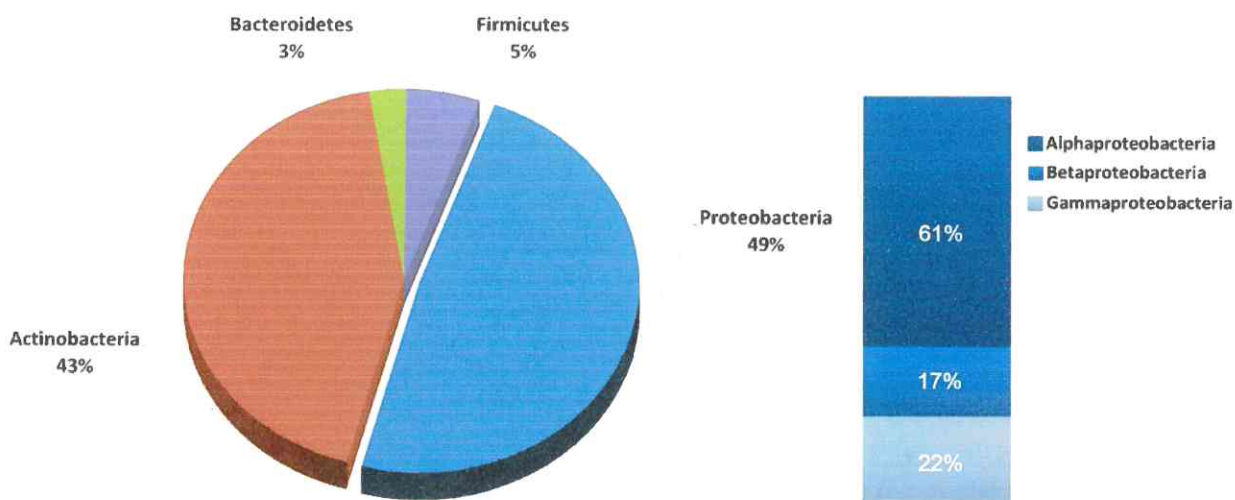


Figura 4.8- Distribuição por filo dos isolados bacterianos identificados e por classe do filo Proteobacteria.

A distribuição e diversidade de gêneros encontrados por filo estão representadas na Tabela 4.2 e na árvore filogenética apresentada na Figura 4.9.

Tabela 4.2- Diversidade de gêneros/família correspondente a cada filo e classe.

Filo	Classe	Gêneros ou família
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Marteella, Mesorhizobium, Ochrobactrum, Paracoccus, Sphingomonas, Sphingopyxis, Thalassospira</i>
	Betaproteobacteria	<i>Achromobacter</i>
	Gammaproteobacteria	<i>Mangroveibacter, Pseudomonas, Xanthomonadaceae</i>
Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Brachybacterium, Curtobacterium, Dietzia, Gordonia, Leifsonia, Micrococcus</i>
Bacteroidetes	Bacteriodetes	<i>Cytophaga</i>
Firmicutes	Bacilli	<i>Bhargavaea, Staphylococcus</i>

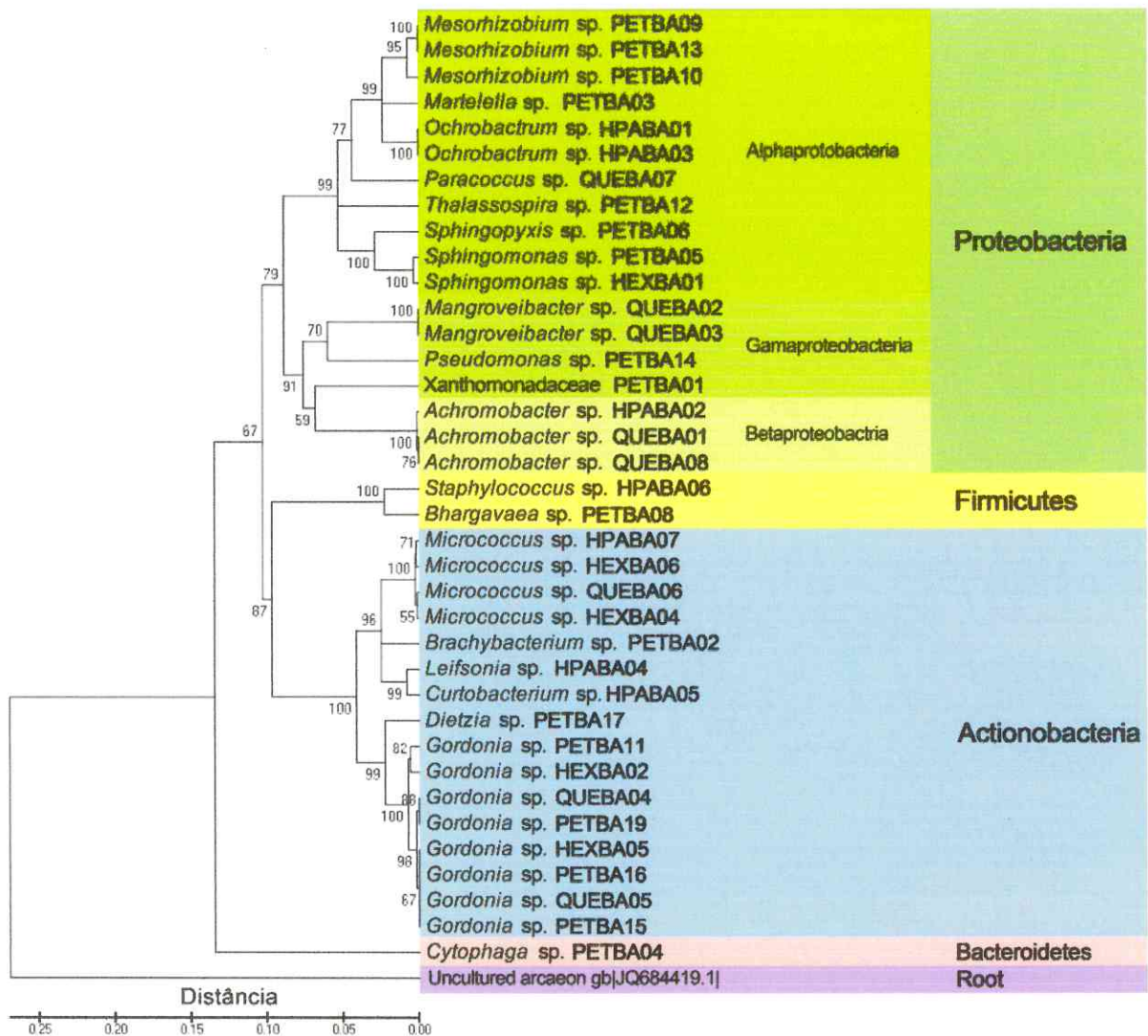


Figura 4.9- Árvore filogenética construída a partir do alinhamento múltiplo das sequências do gene codificador para o rRNA16S das 37 linhagens identificadas. As relações entre as sequências foram estabelecidas com o algoritmo *neighbor-joining* com base na distância Euclidiana entre as mesmas. A estabilidade dos dados foi inferida pelo teste de *bootstrap* com 1.000 reamostragens. Os valores de *bootstrap* são encontrados nos nós.

Embora a técnica de enriquecimento seja seletiva, foi recuperada uma alta riqueza de gêneros de bactérias, considerando a identificação de 20 gêneros diferentes em 37 isolados identificados. Dentre os gêneros obtidos, 16 são exclusivos de algum dos consórcios, demonstrando que as diferentes pressões nos enriquecimentos selecionaram microorganismos com atividades catabólicas específicas. Apenas 4 gêneros (*Acromobacter*, *Gordonia*, *Micrococcus* e *Sphingomonas*) foram compartilhados por pelos menos dois tipos de enriquecimentos (FIGURA 4.10).

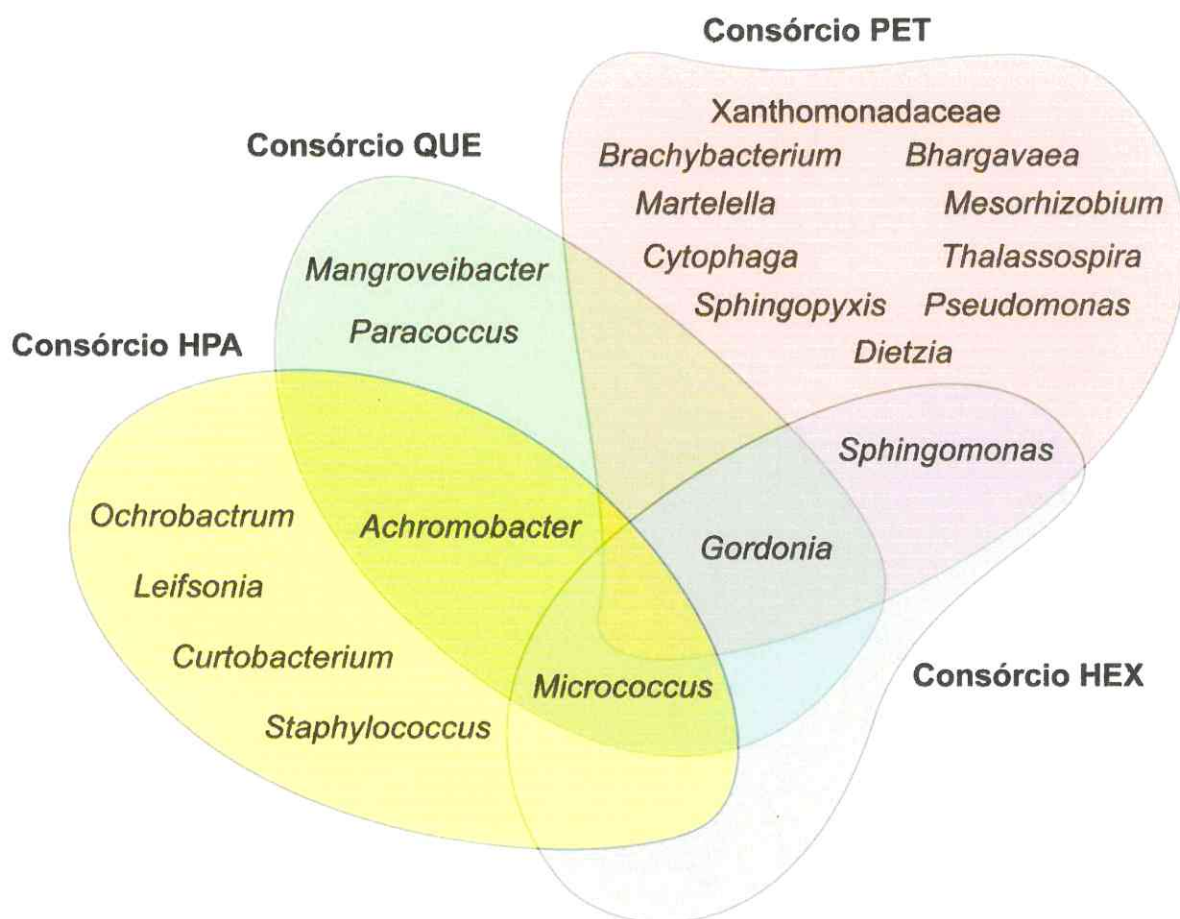


Figura 4.10- Representação da distribuição de gêneros bacterianos em consórcios obtidos por diferentes enriquecimentos.

4.3.5 Produção de SACs e caracterização das emulsões

A produção de SACs foi feita em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono. Foram testadas as cepas de bactérias isoladas das culturas do 45º dia de enriquecimento e seus respectivos consórcios. Foi feita uma análise do crescimento de cada cepa isoladamente e dos consórcios através de medidas de absorbância a 600 nm, monitoramento do pH e pesquisa de emulsificantes e desemulsificantes.

A Figura 4.11 apresenta os monitoramentos de crescimento dos consórcios e de suas respectivas cepas de bactérias separadamente. Como pode ser observado, exceto pela cepa HEXBA02, proveniente do enriquecimento com hexadecano, que não foi capaz de usar glicerol como fonte de carbono e, portanto, não cresceu no meio mineral, a maioria das cepas estava em crescimento exponencial com 24 h. De uma maneira geral não foram observadas diferenças significativas entre os isolados provenientes dos diferentes enriquecimentos para usar o glicerol como fonte de carbono, exceto pelas cepas PETBA01 e PETBA12, que com 24 h ainda se encontravam em fase lag. Os quatro consórcios também não diferiram e foram capazes de crescer usando glicerol. De uma maneira geral não foram observadas variações significativas de pH para a maioria das culturas. Entretanto, houve produção de ácidos nas culturas das cepas QUEBA02 e QUEBA03, que ao final de 72 h estavam com pH 5,9 e 5,7, e no consórcio QUE, no qual se verificou um abaixamento acentuado do pH, que passou de 7,2 para pH 4,7 (FIGURA 4.12). Além de ácidos, QUEBA02 e QUEBA03, ambas do gênero *Mangroveibacter*, e o consórcio QUE, produziram gás. A presença de gases foi verificada no momento de abertura dos frascos através da liberação brusca da pressão interna nos Erlenmeyers. Darvishi *et al.* (2011) relataram a formação de gases durante a produção de biossurfactantes utilizando bactérias da família Enterobacteriaceae, que produzem consideráveis quantidade de gases por substrato consumido. A produção de gases tem sido mencionada como importante para a recuperação de óleo de reservatório, pois esse processo aumenta a pressão em ambiente confinado e reduz a viscosidade do óleo facilitando sua captação.

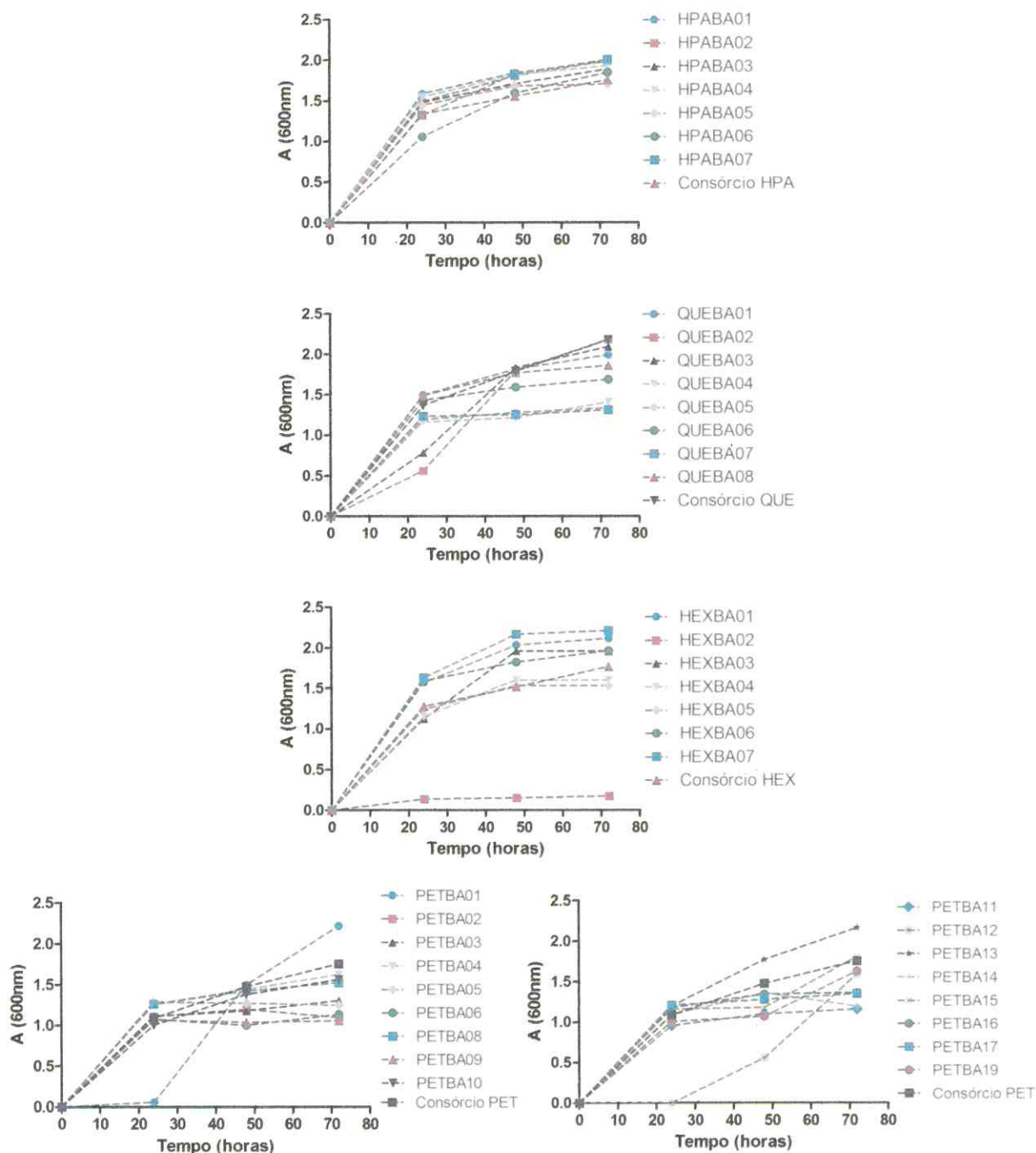


Figura 4.11- Monitoramento de crescimento dos consórcios bacterianos em meio mineral com glicerol.

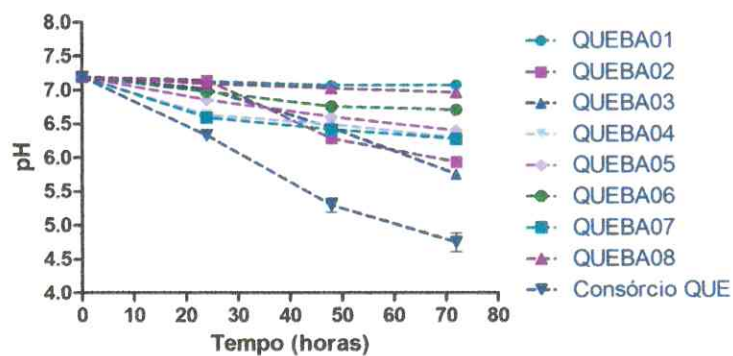


Figura 4.12- Variação de pH durante o crescimento do consórcio QUE em meio mineral com glicerol.

Também foi observada uma relação positiva entre crescimento e acidificação do meio na cultura das cepas PETBA01, PETBA 13 e HEXBA07, que reduziu o pH para 5,1, 5,7 e 5,4, respectivamente.

Os resultados dos ensaios de emulsificação forneceram informações importantes sobre o comportamento das cepas isoladamente e dos seus consórcios. As emulsões produzidas foram caracterizadas como pertencentes aos tipos I, II, III e IV, de acordo com Winsor (1954). O tipo I refere-se a sistemas de duas fases que correspondem a emulsões de óleo em água (O/A) coexistindo com uma fase de água. O tipo II, também bifásica, constitui-se de uma emulsão de água em óleo (A/O) coexistindo com excesso de óleo. O tipo III é formado quando o surfactante é concentrado na fase do meio e a emulsão coexiste com as fases de óleo e água formando um sistema trifásico. Já o tipo IV correspondente a uma região monofásica representada por uma emulsão homogênea (BELLOCQ et al., 1984).

Das 39 cepas avaliadas, 80% foram capazes de produzir emulsificantes que apresentaram diferentes percentuais de emulsificação que variaram de 10 a 65% (FIGURA 4.13-4.16), sendo, portanto, consideradas candidatas para produção de SACs, visando futuras aplicações biotecnológicas.

Dentre as linhagens dos consórcios HPA, QUE e PET foram detectadas as cepas com os melhores percentuais de emulsificação água/óleo (A/O) entre 40-65%. De maneira geral, o consórcio HEX e suas cepas foram os que apresentaram os percentuais mais baixos de emulsificação. Outro resultado que merece destaque é o fato de que em cada um dos grupos tem pelo menos uma cepa não produtora de SAC. As análises também mostraram que a maioria das culturas produziu emulsificantes ao final de 24 ou 48 h de cultivo.

Os consórcios HPA e QUE com todas as cepas reunidas mantiveram bons percentuais de emulsificação A/O comparados às cepas isoladamente. Já o consórcio PET não produziu emulsão do tipo A/O, mesmo possuindo cepas que produzem individualmente.

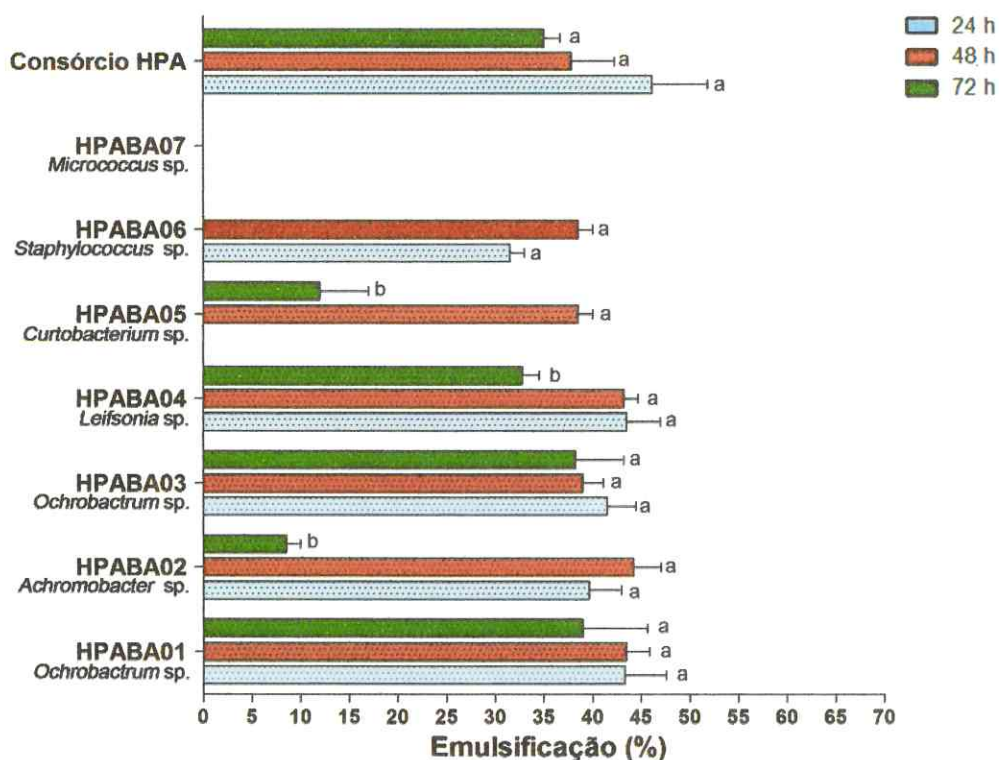


Figura 4.13- Percentuais de emulsificações das cepas e do consórcio HPA. Letras iguais dentro os diferentes tempos em cada isolado bacteriano significam resultados estatisticamente iguais ($p > 0,05$), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com um pós-teste de Tukey.

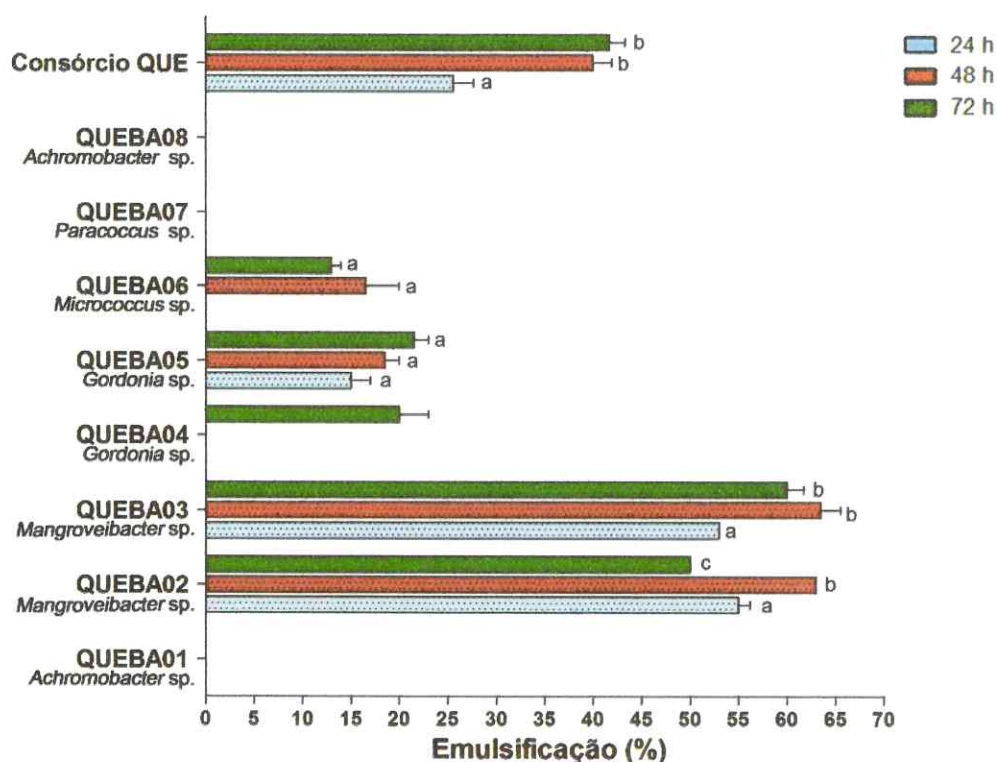


Figura 4.14- Percentuais de emulsificações das cepas e do consórcio QUE. Letras iguais dentro os diferentes tempos em cada isolado bacteriano significam resultados estatisticamente iguais ($p > 0,05$), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com um pós-teste de Tukey.

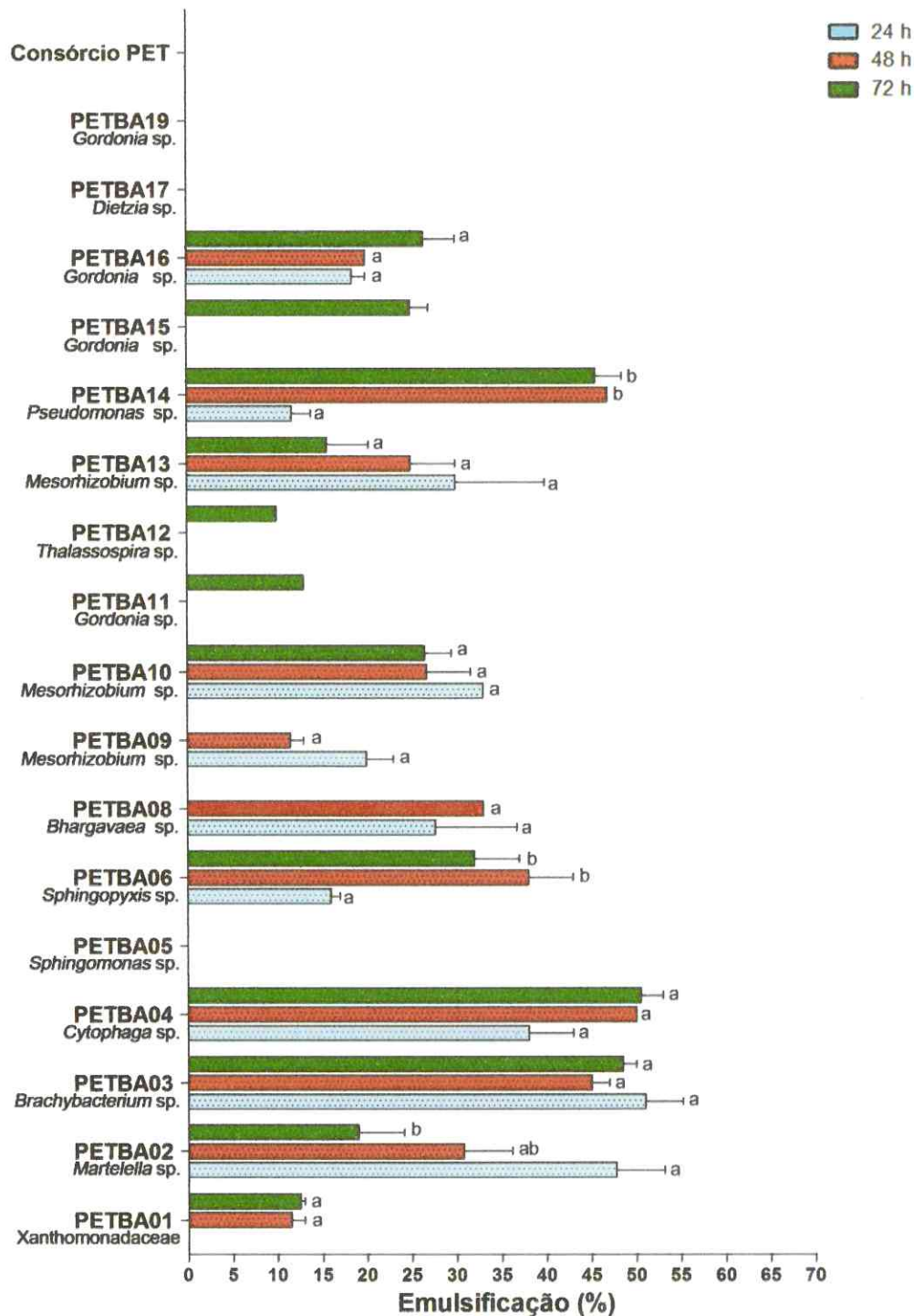


Figura 4.15- Percentuais de emulsificações das cepas e do consórcio PET. Letras iguais dentre os diferentes tempos em cada isolado bacteriano significam resultados estatisticamente iguais ($p > 0,05$), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com um pós-teste de Tukey.

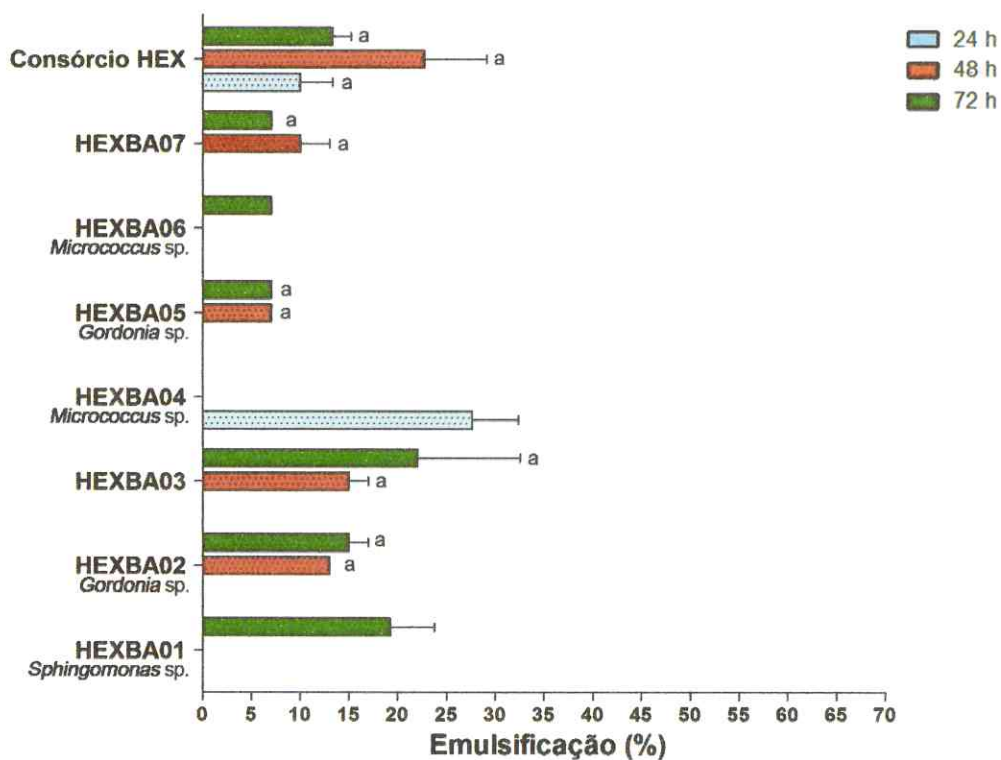


Figura 4.16- Percentuais de emulsificações das cepas e do consórcio HEX. Letras iguais dentre os diferentes tempos em cada isolado bacteriano significam resultados estatisticamente iguais ($p > 0,05$), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com um pós-teste de Tukey.

As linhagens QUEBA5, PETBA15 e PETBA16 não apresentaram atividade emulsificante do tipo água/óleo, mas produziram emulsões do tipo óleo em água (O/A). A Figura 4.17 ilustra os dois tipos emulsões.

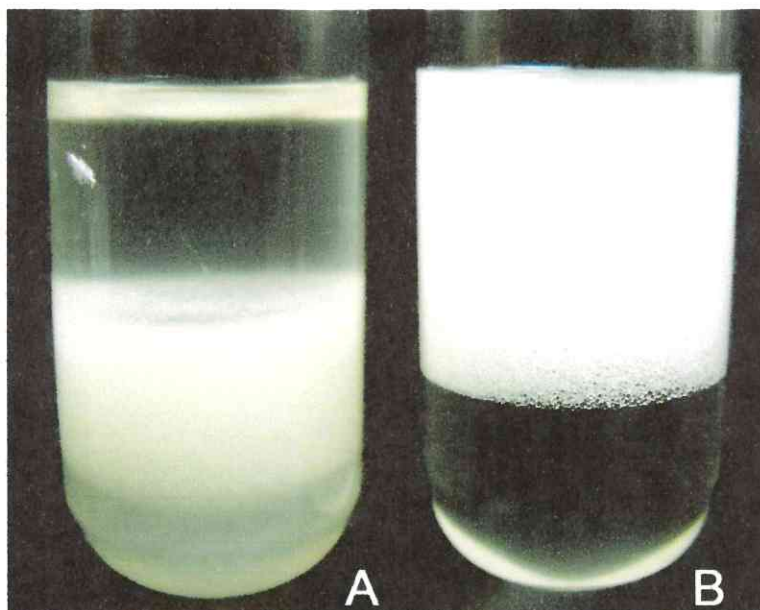


Figura 4.17- Representação dos tipos de emulsões óleo-água O/A (A) e água-óleo A/O (B) produzidos pelas cepas PETBA16 e PETBA03, respectivamente.

Para descobrir se as moléculas responsáveis pela atividade emulsificante do tipo O/A eram intracelulares ou secretadas para o meio, as células e o sobrenadante foram separados por centrifugação e utilizados separadamente em ensaios de emulsificação. Os resultados revelaram que em todos os casos a atividade estava relacionada a moléculas aderidas a superfície celular.

Na literatura, o gênero *Gordonia* é descrito como produtor de lipopolissacarídeos com atividade emulsificante que ao serem produzidos ficam aderidos na parede celular bacteriana (FRANZETTI *et al.*, 2008; LIN *et al.*, 2005). Nesse estudo todas as cepas produtoras de emulsões O/A foram do gênero *Gordonia*. Nos experimentos foi observado que ao se deixar os tubos com as emulsões O/A das linhagens QUEBA05 e PETBA16 em repouso houve um aumento da camada emulsionada com formação de bolhas de ar. Além disso, após agitação as emulsões tornavam-se mais estáveis. Esse fenômeno foi potencializado depois de longos períodos de repouso e agitações. Esse fenômeno possui relação com a produção de polissacarídeos aderidos a parede celular, que serve para regular a flutuabilidade, bem como para acessar a camada de hidrocarboneto na interface água-óleo. Tem também relação com a captação de hidrocarbonetos para dentro das células durante o processo de biodegradação (LIN *et al.*, 2005).

A pesquisa de atividade desemulsificante de emulsões A/O demonstrou que as cepas HEXBA2, QUEBA4, QUEBA5, PETBA15, PETBA16 e PETBA17 foram positivas, isto é, foram capazes de desestabilizar as emulsões com *Tween* 80 0,1% (v/v). A Figura 4.18 demonstra o aspecto da desemulsificação após 24 h.

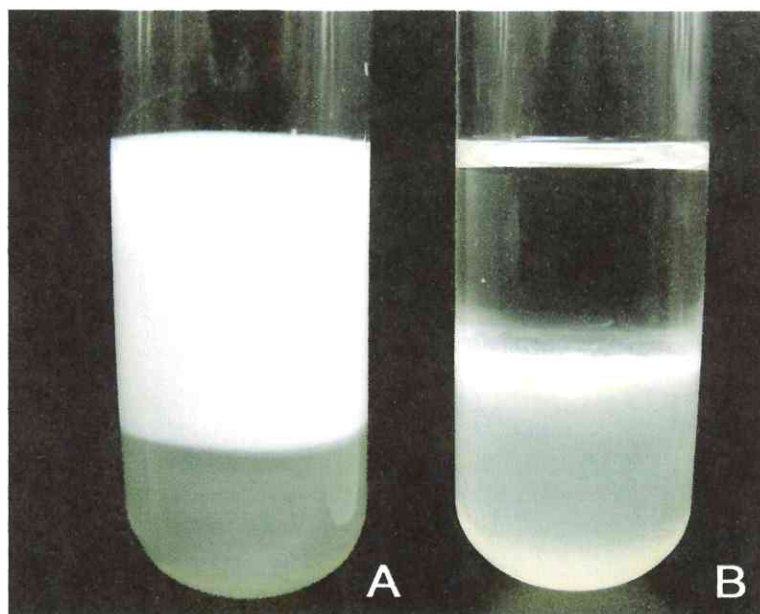


Figura 4.18- Aspecto do controle positivo constituído por uma emulsão do meio mineral em querosene utilizando *Tween* 80 (A) e sua desemulsificação após tratamento com a cultura da cepa PETBA16 (B).

Dentre as seis cepas produtoras de desemulsificantes, quatro (QUEBA5, PETBA15, PETBA16 e PETBA17) se destacaram por desfazer completamente as emulsões dentro de 24 h. Interessantemente, essas cepas pertencem ao gênero *Gordonia* e são as mesmas que produziram emulsões do tipo O/A, com exceção da cepa PETBA17, que não produziu nenhum tipo de emulsão (A/O ou O/A) e pertence ao gênero *Dietzia*.

Para entender a contribuição dos isolados na atividade emulsificante dos consórcios foram preparadas e testadas as seguintes combinações: consórcios PET e QUE completos; consórcios PET e QUE sem as linhagens desemulsificantes (PETBA-D e QUEBA-D); e consórcio PET sem as cepas de *Gordonias* e produtoras de desemulsificantes (PETBA-GD). Os resultados de emulsificação estão apresentados na Figura 4.19.

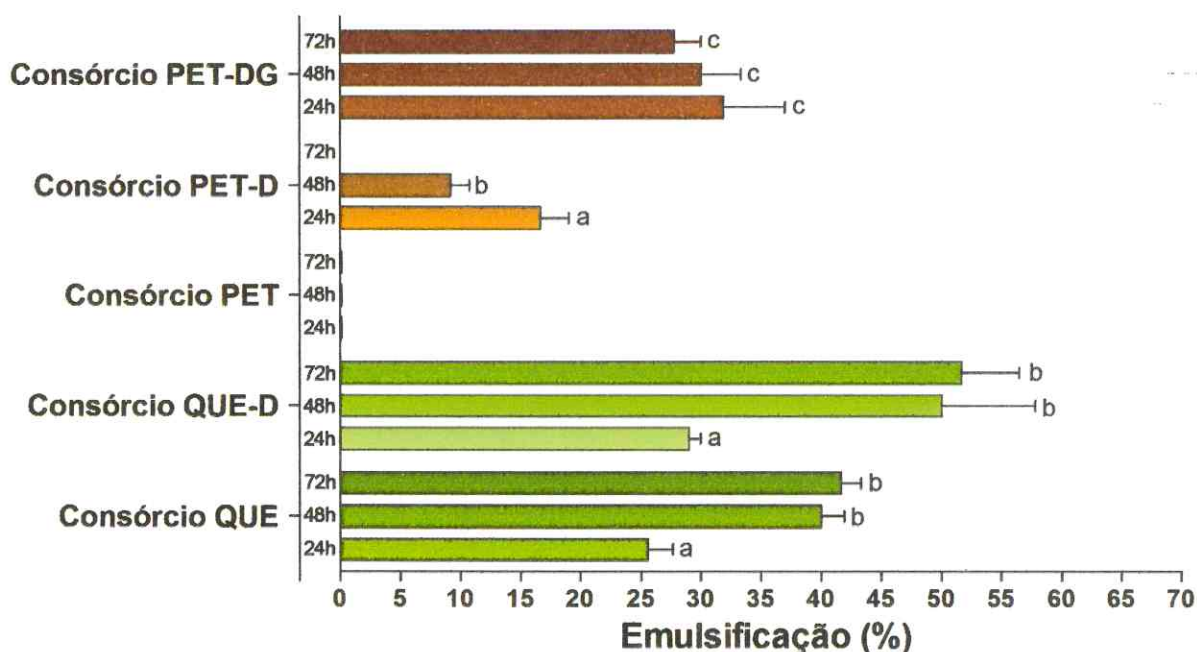


Figura 4.19- Percentuais de emulsificação dos consórcios PET e QUE, dos consórcios sem as linhagens desemulsificantes (PET-D e QUE-D) e do consórcio PET sem as cepas de *Gordonia* e produtoras de desemulsificante (PET-DG). Letras iguais entre cada consórcio e suas variações significam resultados estatisticamente iguais ($p > 0,05$), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com um pós-teste de Tukey.

A retirada das cepas desemulsificantes e das cepas de *Gordonias* e produtoras de desemulsificantes do consórcio PET promoveu a produção de emulsão e um aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade emulsificante do consórcio, respectivamente. Esses resultados comprovam a ocorrência de interação entre membros isolados do consórcio que estavam impedindo ou desestabilizando a atividade emulsificante.

Em relação ao consórcio querosene, apesar dos maiores valores médios de emulsão do consórcio QUE-D comparado ao QUE, as análises estatísticas não permitiram afirmar que ocorreu melhora da atividade emulsificante ($p < 0,05$) com a retirada das cepas desemulsificantes.

A análise das emulsões por microscopia de campo claro mostrou que todas as emulsões A/O produziram gotículas esféricas com aspecto regular de superfície. Cada gota de água é envolvida por um filme lamelar composto por biossurfactantes. Já o consórcio PET-DG apresentou, além de gotículas regulares, emulsões com superfície de aspecto irregular e mucilaginoso, que provavelmente são decorrentes da produção de moléculas emulsificantes de natureza polissacarídica (FIGURA 4.20).

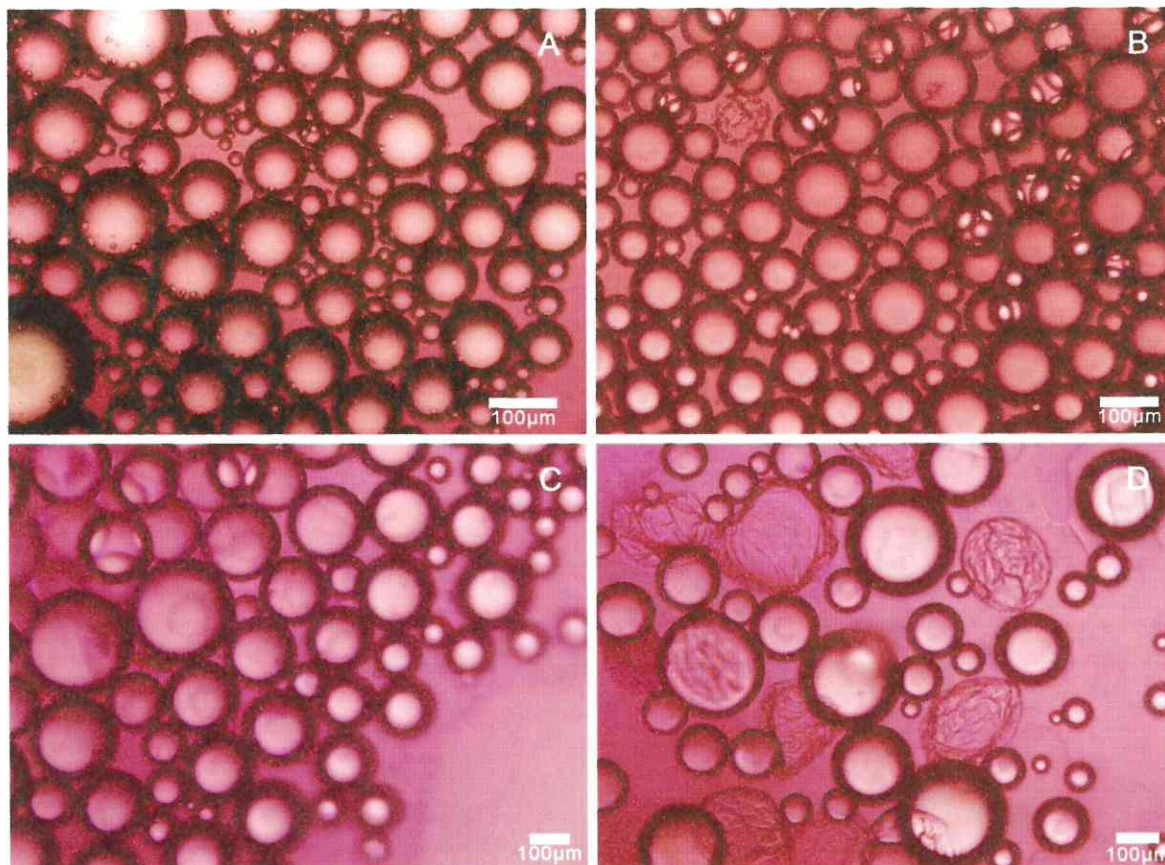


Figura 4.20- Aspecto das emulsões (A/O) de água e querosene produzidas pelos consórcios HPA (A), QUE (B), QUE-D (C) e PET-DG (D). As fotos foram realizadas com aumento de 100X.

As emulsões O/A dos isolados PETBA16 e QUEBA05 apresentaram gotículas de tamanhos variados com a presença de macroestruturas de aspecto mucilaginoso (FIGURA 4.21), provavelmente, oriundas da produção de bioemulsificantes poliméricos de alta massa molecular. Essas moléculas são capazes de formar gotículas maiores comparadas com as formadas por biossurfactantes de baixa massa molecular (TADROS *et al.*, 2004).



Figura 4.21- Aspecto das macroemulsões produzidas pelas linhagens PETBA16 (A) e QUEBA05 (B). As fotos foram realizadas com aumento de 100X.

A observação das emulsões de querosene por microscopia de contraste de fase a partir de biomassa concentrada das linhagens QUEBA05 e PETBA16, produtoras de bioemulsificantes, revelaram um maior número de micelas e uma formação de biofilmes mucilaginosos devido ao aumento da concentração dos biopolímeros (FIGURA 4.22).

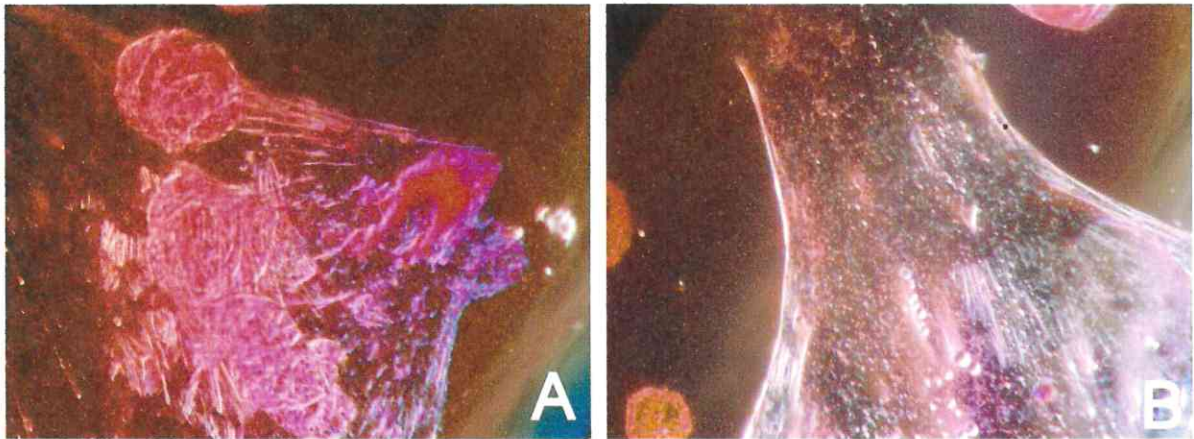


Figura 4.22- Aspecto da formação de biopolímeros (A e B) produzidos pela linhagem QUEBA 05 revelado por microscopia de contraste de fase. Foi utilizado o aumento da máquina digital para fotografar os biopolímeros.

4.4 DISCUSSÃO

As atividades de exploração e refino de petróleo na Baía de Todos-os-Santos tiveram início na década de 50, quando ali foi instalada a refinaria Landulpho Alves – Mataripe (RLAM). Infelizmente, naquela época não havia uma consciência coletiva sobre os danos ambientais que poderiam decorrer dessas atividades e muito menos legislação de proteção dos manguezais. O desenvolvimento dessa nova atividade industrial na Bahia trouxe progresso e benefícios econômicos para a sociedade, mas também danos ambientais incomensuráveis. Notadamente as áreas de produção, portuária e da refinaria, localizadas na região central e norte da baía, são as que apresentam os maiores passivos ambientais, decorrentes das atividades rotineiras da indústria petrolífera, do tráfego de navios, dos vazamentos de dutos de óleo e/ou derivados, do descarte de água produzida, e dos acidentes em unidades portuárias e refinarias. Muitos desses acidentes foram noticiados pela mídia, embora oficialmente não se conheça a extensão do volume de óleo derramado neste manguezal. O que é fato é que ainda existe uma borra oleosa impregnando os sedimentos e a biota local. Nos horários mais quentes do dia, a borra se torna mais fluida e exsuda do sedimento e da rizosfera do mangue. Comparado a manguezais prístinos, pode-se afirmar que o manguezal da Baía de Todos-os-Santos apresenta sintomas visíveis de degradação e redução de sua floresta, assim como da sua fauna acompanhante.

Estudos de biomarcadores de petróleo contaminantes no sedimento do manguezal da Baía de Todos-os-Santos indicam uma origem complexa para a matéria orgânica estocada no sedimento deste manguezal associada a vegetais superiores, provavelmente ligada ao manguezal, a derrames acidentais de óleos de diferentes tipos e /ou lançamentos de esgotos domésticos e industriais, além de um alto grau de degradação dos óleos derramados no ambiente (CELINO et al., 2008). A presença dos isoprenóides pristano e fitano, bem como as razões entre as suas concentrações, e os biomarcadores saturados cíclicos são indicativos da poluição crônica por compostos orgânicos relacionados ao complexo petrolífero (CELINO et al., 2008). Nesse ecossistema, a contaminação é composta por hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP) e aromáticos (HPA). A alta porcentagem da mistura complexa não-resolvida (MCNR) representada por cerca de 50 a 70% dos HTP, é outro indicativo do grau elevado de contribuição antropogênica e da presença de resíduos degradados de petróleo (CELINO; QUEIROZ, 2006; QUEIROZ; CELINO, 2008). Em relação às origens dos óleos, estudos de biomarcadores apontam para uma mistura de fontes diversas regiões e, predominantemente, de óleo produzido na própria Bacia do Recôncavo baiano (CELINO et al., 2008).

Os sedimentos de manguezais são naturalmente vulneráveis à acumulação de poluentes, em decorrência de sua granulometria fina, com elevadas porcentagens de silte e argila. O tamanho dos grãos é um fator muito importante na acumulação de nutrientes, porque as frações mais finas possuem uma alta capacidade de retenção de compostos orgânicos devido à maior área de superfície (LAW, 1981). Os sedimentos analisados nesse estudo continham 72% de silte-argila e 6,5% de matéria orgânica. O teor de matéria orgânica em sedimentos de manguezais é muito variável, sendo influenciado pelo regime de maré e pela drenagem de águas contaminadas provenientes de esgotos domésticos e industriais (BERNINI *et al.*, 2006). Entretanto, os valores foram próximos aos encontrados em outros estuários brasileiros: 3,4 - 5,4% em Itacorubi/SC (DA SILVA *et al.*, 2005), 3,0 - 5,5% na Baía de Guanabara/RJ (BAPTISTA NETO; SMITH; McALLISTER, 2000; CARREIRA *et al.*, 2001) e 7,5 % na Ilha do Cardoso/SP (DIAS *et al.*, 2010).

Nesse ecossistema existem gradientes de altas e baixas concentrações de óleo como uma função da distância das fontes poluidoras. A borra oleosa encontrada impregnando os sedimentos do manguezal da Baía de Todos-os-Santos distribui-se de forma heterogênea, horizontal e verticalmente na camada de sedimento. O regime da maré, o clima tropical e a frequente atividade de remoção de borra nesse sedimento por funcionários da indústria petrolífera local, colaboram para o deslocamento difuso da borra no sedimento, dificultando um diagnóstico preciso do passivo ambiental (FIGURA 4.23). O fato é que após mais de 10 anos de trabalhos de recuperação e monitoramento essa área da Baía de Todos-os-Santos demonstra a persistência de uma borra oleosa, recalcitrante, que contribui para a degradação do ambiente.



Figura 4.23- Coleta de borras oleosas dispersas no sedimento do manguezal da Baía de Todos-os-Santos (A) e armazenamento do material coletado em recipientes de ferro (B).

Importante destacar, que à medida que a sociedade e as leis foram avançando em direção à proteção dos ecossistemas, a indústria petrolífera foi se adequando para atender essas novas exigências, e a natureza, conseqüentemente, vem se beneficiando com a redução de acidentes. Além da proteção legal dos manguezais, o setor industrial, as universidades e o governo vêm investindo para recuperar áreas de manguezais contaminadas. Uma das iniciativas que merece destaque foi a criação em 2001 da Rede Cooperativa em Recuperação de Áreas Contaminadas por Atividades Petrolíferas – RECUPETRO, com o objetivo de desenvolver e testar processos de descontaminação no manguezal da Baía de Todos-os-Santos. Os resultados dessa tese são um dos frutos dessa Rede na área de biorremediação.

A primeira parte desse estudo se debruçou sobre o conhecimento da microbiota presente nos sedimentos contaminados visando à utilização desse conhecimento no desenvolvimento de consórcios para bioaugmentação. Assim, os sedimentos foram submetidos a enriquecimento em quatro diferentes fontes de hidrocarbonetos, incluindo hexadecano, querosene, uma mistura de três HPAs e petróleo bruto, como fontes exclusivas de carbono e energia para assegurar a seleção de bactérias capazes de degradar esses hidrocarbonetos, assim como espécies produtoras de compostos ativos de superfície.

As subamostras de uma amostra composta do sedimento deram origem a diferentes comunidades de bactérias, específicas para cada uma das fontes de carbono testadas. O enriquecimento com petróleo propiciou a obtenção do maior número de isolados bacterianos, 17 isolados, que pode ser atribuído à diversidade de hidrocarbonetos presentes no petróleo bruto, comparado aos enriquecimentos com as outras frações, onde foram obtidos entre 7-8 isolados. Interessantemente, as diferentes pressões seletivas das diferentes fontes de carbono selecionaram comunidades bacterianas distintas, especializadas em degradar hidrocarbonetos específicos. Dentre os 20 gêneros encontrados, 4 (*Curtobacterium*, *Leifsonia*, *Ochrobactrum*, *Staphylococcus*) são exclusivos do consórcio HPA, 2 (*Mangroveibacter* e *Paracoccus*) exclusivos do consórcio Querosene (QUE) e 10 (*Brachybacterium*, *Bhargavaea*, *Cytophaga*, *Dietzia*, *Martellella*, *Mesorhizobium*, *Pseudomonas*, *Sphingopyxis*, *Thalassospira* e *Xanthomonadaceae*) exclusivos do consórcio Petróleo (PET). Já o consórcio Hexadecano (HEX) só apresentou os seguintes gêneros: *Micrococcus* compartilhado com os consórcios HPA e QUE, *Gordonia* compartilhado com os consórcios QUE e PET, e *Sphingomonas* compartilhado com o consórcio PET. O gênero *Acromobacter* foi comum aos consórcios HPA e QUE. A recuperação dessas comunidades demonstra que a biodegradação de hidrocarbonetos em ambientes naturais dificilmente pode ser atribuída a uma única espécie microbiana. Nenhum micro-organismo sozinho é capaz de degradar a diversidade de

compostos existentes no petróleo, devido à riqueza de diferentes tipos de moléculas. A complexidade das rotas de degradação induz a formação de consórcios com micro-organismos de diferentes gêneros e espécies especializados em degradar algum ou vários compostos oleosos (JACQUES *et al.*, 2007; TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010).

A utilização de sedimentos de manguezais contaminados com petróleo em técnicas de enriquecimento para isolamento de cepas bacterianas com boa capacidade de degradar hidrocarbonetos tem sido explorada com sucesso (GUO *et al.*, 2005; HUIJIE *et al.*, 2011; TAM *et al.*, 2002; TIAN *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2008). A presença de compostos hidrocarbônicos nestes ambientes favorece o processo de aclimação e adaptação da microbiota residente, selecionando muitas espécies com capacidade de utilizar esses contaminantes como substrato de crescimento, o que faz com que esses ambientes contaminados possuam uma maior capacidade suporte para comunidades microbianas com potencial para degradar poluentes do que ambientes sem histórico de contaminação (KE *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2011a).

Nesse momento merece destaque a riqueza de gêneros de bactérias cultiváveis (20 gêneros), relativos a 39 isolados capazes de degradar o petróleo e/ou derivados, recuperados de sedimentos desse manguezal. Essa riqueza impressionante sinaliza que a solução para a descontaminação da borra oleosa está no próprio sedimento, basta acionar o gatilho certo para acelerar os processos metabólicos operantes no local.

O processo de degradação de hidrocarbonetos inicia-se pioneiramente com micro-organismos resistentes a compostos que podem ser tóxicos para certos membros da comunidade microbiana. Essa degradação pioneira gera subprodutos capazes de serem utilizados por outras espécies como substrato de crescimento (JACQUES *et al.*, 2007; TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010; RICHARD; VOGEL, 1999). Atualmente, várias pesquisas estão sendo desenvolvidas em busca de consórcios microbianos, por estes serem mais eficientes do que as culturas puras na degradação de poluentes do petróleo. A complementaridade metabólica em consórcios microbianos é essencial nos processos de metabolização de alguns hidrocarbonetos, podendo mineralizar completamente estes compostos (JACQUES *et al.*, 2007; TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010).

Todas as linhagens isoladas a partir das culturas de enriquecimento neste trabalho são importantes no processo de degradação. Richard e Vogel (1999) demonstraram que a composição de consórcios bacterianos para degradação de hidrocarbonetos não necessariamente deve ser formada somente por linhagens hidrocarbonoclasticas. Esses pesquisadores revelaram que a participação de micro-organismos não degradadores primários

de hidrocarbonetos melhora as interações metabólicas durante as etapas do processo de degradação e aumenta a eficiência e o rendimento catabólico.

O potencial biodegradativo de micro-organismos isolados de ambientes contaminados com hidrocarbonetos é muito elevado devido aos mecanismos e habilidades metabólicas selecionadas. Dentre os mecanismos de adaptação microbiana a ambientes contaminados com petróleo, destacam-se: habilidade de modificar a membrana celular para manter as funções biológicas; produção de compostos ativos de superfície como biosurfactantes; presença de bombas de efluxo, que diminuem as concentrações de compostos tóxicos no interior da célula; e mudanças na estrutura genética das comunidades, que resultam em um aumento no número de micro-organismos portadores de genes envolvidos na metabolização de hidrocarbonetos (BAMFORTH; SINGLETON, 2005; TYAGI; FONSECA; CARVALHO, 2010). Portanto, o uso de consórcios microbianos, como os quatro consórcios selecionados neste trabalho, destaca-se como uma opção interessante e eficiente para aplicações em processos de degradação de hidrocarbonetos, bem como produção de SACs durante processos de biorremediação.

A avaliação da eficiência do enriquecimento para a seleção de isolados degradadores de HPAs, escolhido como modelo de estudo, por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), revelou que após 15 dias não ocorreu seleção de bactérias, já que o perfil da comunidade era ainda muito semelhante àquele do sedimento inicial. A presença de compostos facilmente degradáveis provenientes da matéria orgânica do próprio sedimento pode inibir a degradação de poluentes-alvos devido à utilização preferencial de substrato (ALVAREZ; ILLMAN, 2006). Portanto, tudo indica que apenas com a diminuição na quantidade de matéria orgânica original dentro do meio de enriquecimento, promovido pelo tempo de cultivo e as diluições realizadas nos subcultivos, foi possível a seleção de micro-organismos capazes de metabolizar os contaminantes (HPAs) presentes na cultura.

A pressão seletiva proveniente da mistura de HPAs no meio foi efetivada depois de 15 dias, como observado pela redução e mudança no perfil de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) ou na riqueza da comunidade. Nesse período ocorreu o aparecimento de bandas correspondentes a bactérias capazes de degradar HPAs em detrimento de bactérias que não são capazes de utilizar ou sobreviver na presença desses compostos. A técnica de DGGE possui um limite de resolução mínimo capaz de detectar através de bandas apenas espécies dominantes em amostras ambientais. Logo, essas modificações na estrutura da comunidade bacteriana não devem ser interpretadas como o surgimento e desaparecimento de espécies, e sim como alterações na densidade relativa entre populações. Nessa dinâmica o aumento em

algumas populações coloca outras abaixo do limite de detecção do DGGE (NAKATSU, 2007). Esse consórcio bacteriano selecionado provavelmente está desempenhando uma função importante na degradação de HPAs durante o processo de enriquecimento.

Este estudo demonstra a importância do uso de períodos longos de enriquecimento para garantir a seleção de bactérias hidrocarbonoclásticas e sugere que a comunidade bacteriana autóctone neste ecossistema é capaz de responder a esse tipo de contaminação.

A técnica de DGGE representa uma ferramenta ideal para estudos ecológicos por permitir que um grande número de amostras possam ser analisadas e comparadas. Recentemente, alguns autores também usaram DGGE para estudar o processo de enriquecimento com HPAs para detectar mudanças no perfil da comunidade bacteriana e obter informações úteis sobre a capacidade metabólica, filogenia e composição microbiana (HILYARD *et al.*, 2008; HUIJIE *et al.*, 2011; ITO *et al.*, 2008; LUO *et al.*, 2009; TIAN *et al.*, 2008).

Neste trabalho todos os isolados bacterianos obtidos no final do enriquecimento utilizando HPAs, um total de 7 isolados, apresentaram bandas com mobilidade semelhante às encontradas aos 45 dias, período no qual foi realizado o isolamento de bactérias. Portanto, é evidente que os micro-organismos degradadores de HPAs dominantes no enriquecimento foram cultivados com sucesso.

Huijie *et al.* (2011) também usaram análises de dinâmica populacional por DGGE para acessar consórcios de bactérias degradadoras de HPAs a partir de sedimentos de manguezal e obtiveram um consórcio altamente eficaz para a degradação de fenantreno, capaz de degradar 90% da concentração inicial de 50 mg/L em 3 dias. Tian *et al.* (2008) utilizando a técnica de DGGE para avaliar processos de seleção de micro-organismos por enriquecimentos com 2 meses de duração e quatro diferentes fontes de HPAs (fenantreno, fluorantreno, pireno e benzo(a)pireno) demonstraram que as comunidades de bactérias resultantes do processo de enriquecimento apresentavam comunidades com riquezas de UTOs que variavam de acordo com a recalcitrância das moléculas utilizadas. Os enriquecimentos com HPAs de mais difícil degradação como pireno e benzo(a)pireno apresentavam comunidades com maior riqueza de UTOs comparado com outras seleções utilizando compostos de mais fácil degradação como fenantreno e fluorantreno. Assim, demonstrou-se que degradação de composto poliaromáticos de alto peso molecular requer a participação de consórcios bacteriano em mecanismos de co-metabolização, onde são reunidas várias vias de degradação de diferentes populações.

Nas análises de DGGE dos 7 isolados do enriquecimento com HPAs, a não correspondência de duas bandas presente no período de 45 dias com as originadas pelas cepas isoladas, provavelmente, ocorre devido a estas unidades taxonômicas operacionais (UTOs) serem representadas por bactérias não cultiváveis. Já o fato de alguns isolados apresentarem múltiplas bandas pode ser atribuído à existência de múltiplas cópias do gene codificador para o rRNA16S dentro de um único genoma (NÜBEL *et al.*, 1996). Alguns pesquisadores já relataram que alguns isolados podem ser representados por várias bandas no DGGE (LUO *et al.*, 2009; SATOKARI *et al.*, 2001). No entanto é importante ressaltar que em alguns casos uma única banda no DGGE pode conter DNA de diversas espécies de bactérias que representam numerosas populações (YANG; CROWLEY, 2000). Assim, estas observações demonstram a parcimônia necessária nas análises por DGGE para corretas interpretações.

Estes resultados da análise da dinâmica microbiana durante a seleção dos consórcios bacterianos demonstram que a utilização da técnica de enriquecimento é eficiente na seleção de bactérias com capacidade de degradar compostos específicos e que esse fato pode ser confirmado através da combinação de técnicas clássicas de enriquecimento seletivo e análise molecular.

Os micro-organismos obtidos neste trabalho representam um patrimônio valioso para futuros estudos de degradação e produção de SACs visando aplicações em biorremediação de áreas contaminadas com esses hidrocarbonetos.

Na identificação molecular dos 39 isolados verificou-se a predominância dos filos Proteobacteria e Actinobacteria com 49 e 43%, respectivamente, seguido por Firmicutes e Bacteroidetes, representados por 5 e 3%. Dentro do filo Proteobacteria, a classe mais abundante foi Alphaproteobacteria, seguido por Gammaproteobacteria e Betaproteobacteria.

Estudos de manguezais contaminados e prístinos do Brasil realizados por métodos independentes de cultivo e metagenômicos mostraram composições semelhantes do filo Proteobacteria (40-60%), mas diferentes em relação ao filo Actinobacteria, que normalmente representa cerca de 2-9% (DIAS *et al.*, 2010; PEIXOTO *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2011b; TAKETANI *et al.*, 2010).

Actinobactérias podem ser selecionadas e isoladas com boa representatividade, como neste trabalho, pois fatores relacionados com as condições de isolamento durante técnicas de enriquecimento podem favorecer linhagens bacterianas com elevadas taxas de crescimento em relação à fonte de carbono e a condições de incubações específicas, que muitas vezes não representam as variáveis encontradas no ambiente natural. White *et al.* (2011) realizaram estudos comparativos entre a riqueza de cepas bacterianas isoladas por

técnicas dependentes de cultivo e a descrita por técnicas moleculares em amostras de áreas contaminadas com combustível. Esses pesquisadores relataram disparidades entre as técnicas, foram cultivados 14,8% de isolados do filo Actinobacteria e, mesmo assim, não foram detectados filotipos correspondentes nas análises por sequenciamento de bandas do DGGE e apenas uma abundância desprezível foi encontrada nos estudos metagenômicos por pirosequenciamento.

A alta presença de representantes do filo Actinobacteria dentre os isolados obtidos, provavelmente, deve estar relacionada com a contaminação crônica em ecossistemas de manguezais, visto que ambientes poluídos possuem maior potencial para seleção de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos. PIZA; PRADO; MANFIO (2004) relataram uma abundância significativa de 37% de actinobactérias em um manguezal altamente contaminado, enquanto apenas 9% foram detectadas na área controle, a partir de análise de bibliotecas de 16S rRNA. Esses pesquisadores também encontraram maior riqueza de actinobactérias na área controle, o que demonstra a seleção de micro-organismos ocasionada pela contaminação por óleo. Este foi um dos poucos trabalhos que relataram uma abundância significativa de actinobactérias em resposta a contaminações por hidrocarbonetos.

Para o melhor do nosso conhecimento esta tese é o primeiro trabalho a descrever uma alta recuperação de isolados de Actinobacteria (43%) de um manguezal contaminado com hidrocarbonetos. A maior representatividade dos filios Proteobacteria e Actinobacteria corroboram com o estudo realizado por Peixoto et al. (2011), que demonstraram serem esses dois filios os mais influenciados por poluentes derivados do petróleo em sedimentos do manguezal da Baía de Todos-os-Santos.

O filo Proteobacteria é considerado como o de maior ocorrência e diversificado na natureza, com aproximadamente 528 gêneros descritos, sendo encontrado em diferentes ambientes devido à grande variedade metabólica para obtenção de energia (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004). Além disso, os membros deste filo são considerados micro-organismos eficazes na degradação de hidrocarbonetos, incluindo compostos aromáticos, alifáticos e outros (ATLAS, 1981; LAFORTUNE *et al.*, 2009; PAIXÃO *et al.*, 2010). Em relação ao filo Actinobacteria, esses micro-organismos são eficazes na metabolização de contaminantes, incluindo hidrocarbonetos, e representam bons candidatos para aplicação em biorremediação de sedimentos. Esse grupo também metaboliza uma variedade de fontes de carbono, polímeros complexos, tais como a lignina, e possuem algumas características vantajosas de fungos, como produção de esporos, crescimento micelial e produção de enzimas extracelulares (MCCARTHY; WILLIAMS, 1992). Considerando a diversidade metabólica

associada a estes micro-organismos, pode-se especular que essas cepas são candidatas ideais para processos de biorremediação de áreas contaminadas por petróleo.

Após obtenção e identificação dos consórcios, avaliou-se o potencial de cada cepa e dos consórcios para produzir compostos ativos de superfície. Nesse momento é interessante relembrar alguns aspectos da interação entre fluidos imiscíveis.

A agitação vigorosamente seguida de repouso entre dois líquidos puros e imiscíveis, como querosene e água, resulta na separação rápida em duas fases. Durante a agitação ocorre a formação de gotículas dispersas de um dos líquidos no interior do outro. Quando cessado o fornecimento de energia proveniente pela agitação, as gotículas tendem a coalescer e os líquidos separam-se novamente (TADROS *et al.*, 2004). A energia requerida através da agitação para expandir a área interfacial no sistema através da formação de bolhas é determinada pelo aumento da área interfacial (ΔA) em função da tensão interfacial γ . Logo, como γ é positiva, a energia ($\Delta A \cdot \gamma$) para expandir a interface é alta e positiva. Além disso, a quantidade de energia gerada pelo aumento da área interfacial, imprescindível para formação da emulsão, não é compensada pela baixa entropia de dispersão $T\Delta S$ (valor sempre positivo). Nesse sistema, a energia livre de Gibbs total para formação de emulsões (ΔG) é positiva e resulta em um processo não espontâneo (TADROS *et al.*, 2004).

A relação entre estes parâmetros para formação de emulsões é explicada pela segunda lei da termodinâmica, segundo a equação:

$$\Delta G = \Delta A \gamma - T \Delta S,$$

Onde ΔG = energia livre de Gibbs, ΔA = aumento da área interfacial, γ = tensão interfacial, T = temperatura, ΔS = variação de entropia.

Uma das alternativas para a estabilização de emulsificações seria fornecer energia mecânica continuamente de modo a manter a área interfacial aumentada. Este mecanismo por si só não é suficiente, pois vence a barreira da tensão interfacial apenas temporariamente, enquanto durar a agitação. Dessa forma, dois líquidos puros imiscíveis não são capazes de formar emulsões estáveis sem a presença de forças estabilizantes. Isto é consequência da tendência natural do sistema líquido-líquido de se separar devido à coalescência das gotas com a consequente redução da área interfacial e da energia livre de Gibbs do sistema (ΔG). Portanto, a formação de emulsificações é um processo energeticamente não espontâneo ($\Delta G > 0$), termodinamicamente instável e requer energia (TADROS *et al.*, 2004).

A formação de emulsões só é possível com a presença de estabilizantes de emulsões como os biossurfactantes (moléculas de baixo peso molecular) ou bioemulsificantes (alto peso molecular). Na presença destes compostos é criada uma barreira de energia entre as emulsões, que evita o processo de coalescência e torna o sistema cineticamente estável. Outro efeito da presença de biossurfactantes é a diminuição da tensão interfacial, o que favorece a formação das emulsões menores ao ponto de se conseguir a estabilidade termodinâmica do sistema bifásico. A formação de muitas partículas pequenas (ao invés de poucas partículas grandes) promove um grande aumento na entropia e, portanto, uma redução na energia livre de Gibbs. Este aumento de entropia é suficiente para compensar o aumento da energia livre no sistema (TADROS *et al.*, 2004). Entretanto, os compostos emulsionantes, de forma geral, não conseguem estabilizar o sistema de emulsão indefinidamente, logo, as emulsões são consideradas sistemas termodinamicamente instáveis e procura-se utilizar meios que possam retardar pelo maior tempo possível a separação das fases.

A partir da análise das emulsões nas misturas de água e querosene foi possível detectar a produção de biossurfactante e bioemulsificantes nas culturas das bactérias isoladas e nos consórcios avaliadas nesse estudo. Foi revelado que 80% das 39 culturas de bactérias produziram emulsões, corroborando com resultados da literatura que demonstram haver uma relação positiva entre a produção de biossurfactantes e linhagens de bactérias hidrocarbonoclasticas (CERQUEIRA *et al.*, 2011; CERQUEIRA *et al.*, 2012; NITSCHKE; PASTORE, 2002; RON; ROSENBERG, 2001; VAN HAMME; SINGH; WARD, 2006).

Essa relação baseia-se no fato dos biossurfactantes e bioemulsificantes após serem produzidos no interior das células desempenharem importantes funções fisiológicas como emulsificação e solubilização de compostos oleosos e transporte desses compostos para dentro das células. Outra importante função está relacionada a modificações na constituição bioquímica da superfície celular, onde os micro-organismos podem utilizar moléculas surfactantes ligadas à superfície celular para regular o processo de adesão e desligamento em um determinado substrato de acordo com sua necessidade de encontrar novos ambientes com maior disponibilidade de nutrientes ou se livrar de ambientes desfavoráveis (NITSCHKE; PASTORE, 2002; RON; ROSENBERG, 2002; VAN HAMME; SINGH; WARD, 2006).

A pesquisa de compostos tensoativos foi feita com 24, 48 e 72 h de crescimento porque a maioria das bactérias produz compostos secundários durante o crescimento exponencial ou no final deste, onde a densidade celular é alta o suficiente para acionar o sistema de *quorum sensing* (sinalização celular) e, por conseguinte, ativar genes responsáveis por importantes funções como produção de SACs, antibióticos, metabólitos secundários,

exoproteases, além de características da superfície celular (DANIELS; VANDERLEYDEN; MICHIELS, 2004; RON; ROSENBERG, 2002).

Os compostos agentes de superfície podem ser produzidos e lançados para o meio extracelular ou permanecerem ligadas as células, onde agem principalmente acoplados à parede celular e são classificadas como SACs particulados (NITSCHKE; PASTORE, 2002; RON; ROSENBERG, 2002; VAN HAMME; SINGH; WARD, 2006).

Foi observado que as linhagens obtidas a partir dos enriquecimentos com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), querosene (QUE) e petróleo (PET) se destacaram como boas produtoras de emulsificantes quando cultivadas em meio contendo glicerol como fonte de carbono e energia. Já as linhagens obtidas por enriquecimento com hexadecano (HEX) não foram classificadas boas produtoras de emulsificantes.

Do enriquecimento com HPAs a única linhagem não produtora de emulsificantes foi HPABA07, identificada como *Micrococcus* sp.. As demais linhagens desse grupo, *Ochrobactrum* sp., *Achromobacter* sp., *Leifsonia* sp., *Curtobacterium* sp. e *Staphylococcus* sp., se destacaram como boas produtoras de emulsificantes com percentuais em torno de 40-45%. Merece destaque que dessas, todas produziram emulsionantes com 24 h, com exceção da cepa *Curtobacterium* sp.. As emulsões produzidas pelas linhagens HPABA01 e HPABA02, pertencentes ao gênero *Ochrobactrum*, permaneceram estáveis e não apresentaram reduções significativas durante o experimento, já as demais emulsões diminuíram ou desapareceram completamente (HPABA06) com 72 h. Dentre as cepas promissoras, os gêneros *Achromobacter*, *Ochrobactrum* e *Staphylococcus* já foram descritos como produtores de emulsionantes (CALVO *et al.*, 2008; FERHAT *et al.*, 2011; GHAMGUI *et al.*, 2006; MNIF *et al.*, 2011). Já para os gêneros *Curtobacterium* e *Leifsonia* não foram encontrados relatos de produção de emulsionantes na literatura.

A partir do enriquecimento com QUE foram obtidas oito linhagens, pertencentes aos gêneros *Achromobacter*, *Gordonia*, *Mangroveibacter*, *Micrococcus* e *Paracoccus*. As linhagens QUEBA01 (*Achromobacter* sp.), QUEBA07 (*Paracoccus* sp.) e QUEBA 8 (*Achromobacter* sp.) não produziram emulsificantes nas condições testadas, enquanto as demais linhagens pertencentes aos gêneros *Mangroveibacter* (QUEBA02 e QUEBA03), *Gordonia* (QUEBA04 e QUEBA 05) e *Micrococcus* (QUEBA06) foram capazes de produzir emulsionante. As cepas QUEBA04, QUEBA05 e QUEBA06 produziram fracas emulsões de no máximo 20%. É importante destacar que as duas espécies de *Mangroveibacter* foram as linhagens que produziram as maiores emulsões com 24 h (50-55%), 48 h (60-65%) e 72 h (50-60%) dentre todas as analisadas. Ressalta-se que não foram encontrados registros na

literatura de espécies de *Mangroveibacter* com essa atividade. Já os gêneros *Gordonia* e *Micrococcus* são descritos como produtores de emulsionantes (FRANZETTI et al., 2008; FRANZETTI et al., 2009; FUSCONI et al., 2010; LIN et al., 2005; TULEVA et al., 2009).

Todas as seis linhagens do grupo HEX, pertencentes aos gêneros *Gordonia*, *Micrococcus* e *Sphingomonas*, produziram fraca emulsificação, com índices médios menores do que 25%.

O grupo PET apresentou a maior riqueza de linhagens (17) e de gêneros (12), *Bhargavaea*, *Brachybacterium*, *Cytophaga*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Martelevella*, *Mesorhizobium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*, *Thalassospira* e Xanthomonadaceae. Ressalta-se que as linhagens PETBA05 (*Sphingomonas* sp.), PETBA17 (*Dietzia* sp.) e PETBA19 (*Gordonia* sp.) não produziram nenhuma emulsificação e as linhagens PETBA01 (Xanthomonadaceae), PETBA09 (*Mesorhizobium* sp.), PETBA11 (*Gordonia* sp.), PETBA12 (*Thalassospira* sp.), PETBA15 e PETBA16 (*Gordonia* sp.) produziram baixos índices de emulsificação de no máximo 25%. As linhagens PETBA06 (*Sphingopyxis* sp.), PETBA08 (*Bhargavaea* sp.), PETBA10 (*Mesorhizobium* sp.) e PETBA13 (*Mesorhizobium* sp.) produziram índices de emulsificações um pouco melhores em torno de 30-35%. Por outro lado, PETBA02 (*Brachybacterium* sp.), PETBA03 (*Martelevella* sp.), PETBA04 (*Cytophaga* sp.), e PETBA14 (*Pseudomonas* sp.) produziram índices máximos de emulsificação entre 45-50%, sendo as mais promissoras desse grupo. Dentre as cepas citadas como produtoras de emulsificantes no consórcio PET, os gêneros *Bhargavaea*, *Brachybacterium*, *Cytophaga*, *Martelevella*, *Mesorhizobium*, *Sphingopyxis*, *Thalassospira* não foram previamente relatados como produtores de moléculas com atividade de superfície. Já os demais gêneros e famílias produtores, *Gordonia*, *Pseudomonas* e Xanthomonadaceae já foram relatados (BONILLA et al., 2005; COSTA et al., 2010; DARVISHI et al., 2011; FRANZETTI et al., 2008; FRANZETTI et al., 2009; FUSCONI et al., 2010; LIN et al., 2005).

Os resultados obtidos a partir do estudo de produção de emulsionantes são bastante promissores pela diversidade de linhagens encontradas, o que sugere a produção de moléculas de diferentes classes, possivelmente, até de novas classes de tensoativos, tendo em vista a produção desses compostos por 10 gêneros (*Bhargavaea*, *Brachybacterium*, *Curtobacterium*, *Cytophaga*, *Leifsonia*, *Mangroveibacter*, *Martelevella*, *Mesorhizobium*, *Sphingopyxis* e *Thalassospira*) ainda não descritos como produtores de emulsificantes.

Merece destaque a abundância de espécies de *Gordonia* (20%), recuperadas a partir dos enriquecimentos com QUE, HEX e PET, sendo quadro delas encontradas no grupo PET. O gênero *Gordonia*, pertencente ao filo Actinobacteria, compreende bactérias

corineformes, Gram-positivas, conhecidas por sua capacidade de degradar xenobióticos e produzir exopolissacarídeos. Essas bactérias são ubíquas na natureza, sendo frequentemente isolada de solos contaminados, incluindo manguezais.

Quando as linhagens individuais de bactérias de cada grupo foram reunidas em consórcios e esses foram cultivados em glicerol, observou-se que consórcio HPA teve um desempenho tão bom quanto as melhores linhagens individualmente, produzindo um índice de emulsificação de 45% com 24 h de cultivo. O consórcio QUE manteve a produção de surfactantes, porém apresentou desempenho inferior aos das duas melhores linhagens individualmente, QUEBA02 e QUEBA03. O consórcio HEX não teve desempenho diferente das linhagens isoladas, isto é, produziu fraca emulsificação. Isso provavelmente se deve ao fato do hexadecano ser mais facilmente assimilado pela célula, ao contrário dos demais hidrocarbonetos utilizados nos enriquecimentos com querosene, petróleo ou mistura de HPAs, que além de possuírem moléculas alifáticas possuem compostos aromáticos pouco disponíveis que geram uma maior pressão seletiva para linhagem produtoras de moléculas emulsificantes.

O resultado mais surpreendente foi a não produção de emulsificação pelo consórcio PET. Esse resultado surpreendeu porque esse consórcio reúne 17 linhagens de bactérias, sendo 14 delas produtoras de emulsificantes. Levantou-se a hipótese que a perda da atividade poderia ser devido a modificações das condições ideais de formação e manutenção das emulsões por moléculas produzidas por algumas das linhagens presentes no consórcio.

De fato, a pesquisa de desemulsificantes indicou que as linhagens HEXBA2, QUEBA4, QUEBA5, PETBA15, PETBA16 e PETBA17 eram capazes de desestabilizar as emulsões. Dessas seis linhagens, QUEBA5, PETBA15, PETBA16 e PETBA17 se destacaram por desfazer completamente as emulsões dentro de 24 h. Interessantemente, essas linhagens foram todas do gênero *Gordonia* e foram as mesmas que produziram emulsões do tipo óleo-água, com exceção da cepa PETBA17, que não produziu nenhum tipo de emulsão e pertence ao gênero *Dietzia*.

Para entender a contribuição de cada isolado na atividade emulsificante dos consórcios foram preparadas e testadas as seguintes combinações: consórcios PET e QUE completos; consórcios PET e QUE sem as linhagens desemulsificantes, identificados como PETBA-D e QUEBA-D, respectivamente; e consórcio PET sem as linhagens de *Gordonias* e produtoras de desemulsificantes PETBA-DG. Com esses tratamentos, o consórcio PET-D mostrou atividade emulsificante e o consórcio PET-DG teve sua atividade emulsificante aumentada. Portanto, confirmou-se que as linhagens produtoras de desemulsificantes e, em especial as espécies de *Gordonia* produtoras desses compostos, presentes no consórcio PET,

eram as responsáveis pela completa anulação da atividade emulsificante. Esse estudo mostrou a importância de se analisar separadamente os componentes de consórcios, para evitar antagonismo de funções.

Darvishi *et al.* (2011) e Cerqueira *et al.* (2011) também demonstraram a manutenção da atividade emulsificante por linhagens bacterianas produtoras individualmente quando reunidas. Esses pesquisadores revelaram que os consórcios além de manterem a produção de compostos ativos de superfície foram mais eficientes no processo de biodegradação de hidrocarbonetos. É importante ressaltar que os compostos surfactantes além de fundamental relevância para as linhagens produtoras, também podem ser transferidas para outras espécies microbianas, favorecendo a formação de biofilmes e a degradação por linhagens hidrocarbonoclásticas que não são capazes de produzir moléculas surfactantes (RAVID; RON; RONSENBERG, 2000). Os mecanismos de como os biosurfactantes favorecem o processo de degradação foi descrito por Cameotra e Singh (2009). Esses pesquisadores estudaram o processo de captação de hexadecano por uma linhagem de *P. aeruginosa* produtora de rhamnolipídeo. Foi revelado que a produção de moléculas com atividade de superfície favorece o contato do substrato com a célula. Detectou-se um processo de captação de moléculas de hidrocarbonetos através de um mecanismo de pinocitose na membrana celular.

A aplicação de combinações de diferentes micro-organismos produtores de SACs em consórcios pode ser mais eficiente do que a utilização de linhagens microbianas individuais no processo de reduzir a tensão superficial, formar micelas e melhorar a biodisponibilidade de hidrocarbonetos. Essas vantagens são devido à redução mais acentuada da tensão superficial e interfacial de misturas de surfactantes que favorece o processo de expansão interfacial e, conseqüentemente, a formação de mais e menores micelas que são mais condizentes com a captação de óleo por micro-organismos. Outra vantagem da mistura de emulsificantes está relacionada ao potencial de formar uma variedade maior de espécies de micelas que podem se adaptar às pequenas variações das emulsões ou das condições as quais elas estão submetidas (MCINERNEY *et al.*, 2005; TADROS *et al.*, 2004).

Os SACs sintetizados por micro-organismos possuem uma variedade de composições químicas como glicolipídios, lipopeptídios, lipoproteínas, fosfolipídios, ácidos graxos e surfactantes poliméricos. Essas moléculas também variam em relação ao tamanho podendo possuir alto peso molecular (bioemulsificantes) ou baixo peso molecular (biosurfactantes). Os biosurfactantes de baixo peso molecular são geralmente glicolipídeos, tais como trehalolipídeos, soforolipídios e rhamnolipídeo, proteína, ou lipopeptídeos, tais

como surfactina, gramicidina e polimixina. Esses compostos menores são mais eficazes na redução da tensão interfacial e superficial. Já os bioemulsificantes de elevada massa molecular são polissacarídeos anfipáticos, lipopolissacarídeos e lipoproteínas. Esses compostos maiores são estabilizadores eficazes de emulsões óleo em água (BANAT *et al.*, 2010; ROSENBERG; RON, 1999; VAN HAMME; SINGH; WARD, 2006).

Em processos de emulsificações três etapas são importantes: a adesão de surfactantes, a deformação e a coalescência de gotículas (TADROS *et al.*, 2004). Durante a formação das emulsões em misturas de óleo, água e emulsificantes para que ocorra a deformação das gotículas e expansão da área interfacial é necessário energia. O processo de deformação de gotículas e expansão da área superficial versus a quantidade de energia pode ser entendido através da pressão de Laplace (p), que consiste na diferença de pressão entre o lado externo e interno das gotículas. Para que uma gota possa ser dividida em pequenas gotículas as mesmas devem sofrer fortes deformações e estas modificações aumentam a pressão de Laplace. Quanto menor o tamanho das gotículas maior a energia e a quantidade de emulsificante requerida, ou seja, a obtenção de nanoemulsões em comparação com micro e macroemulsões é mais difícil, requer eficientes surfactantes e forte agitação. Este fenômeno pode ser observado durante o processo de diminuição de tamanho das gotículas, no qual gotas esféricas são deformadas para um formato elipsoide (TADROS *et al.*, 2004).

A manutenção da quantidade de moles de surfactante na área interfacial também é determinante na estabilidade das emulsões. Durante os processos de emulsificações ocorre o aumento da área interfacial e, conseqüentemente, a relação de moles de emulsificantes por área de interface diminui. As moléculas emulsificantes também são removidas pelo fluxo de líquido promovido pelo efeito Gibbs-Marangoni. Logo, para que as emulsões sejam estáveis e ocorra a manutenção do gradiente de tensão é necessária a adesão nas regiões interfaciais de novas moléculas surfactantes livres (TADROS *et al.*, 2004). O efeito Gibbs-Marangoni que promove o movimento de líquido entre as micelas é consequência da formação de um gradiente de tensão interfacial, que determina o fluxo de massa, onde os líquidos tendem a fluir de regiões de menor tensão para outras de maior tensão, visto que quanto maior a tensão superficial maior será a capacidade de atrair as moléculas ao seu redor (TADROS *et al.*, 2004).

Em sistemas de emulsificação com moléculas surfactantes menores e eficientes, como os biosurfactantes, ocorre uma estabilização desta relação e manutenção da estabilidade das emulsões. Já em sistemas com moléculas emulsificante constituídas de polímeros, como os bioemulsificantes, devido à ausência ou baixa velocidade de reposição

dos surfactantes, não ocorre uma manutenção eficiente do equilíbrio, e, conseqüentemente, são geradas emulsões maiores que dependendo da estabilidade podem coalescer e desfazer as emulsões (TADROS *et al.*, 2004).

Cada um dos processos descritos ocorre várias vezes durante a emulsificação e a escala de tempo de cada processo é muito curta, um microssegundo. Isto demonstra como processo de emulsificação é dinâmico e como eventos que ocorrem dentro de um intervalo de microssegundo são importantes.

As emulsões podem ser produzidas em equilíbrio, com excesso de óleo, água ou ambos. Elas possuem uma fase contínua, formada pela substância que é mais prevalente, e uma dispersa. Emulsões tendem a apresentar diferentes aparências devido às muitas fases de dispersão da luz que passam através da emulsão (BELLOCQ *et al.*, 1984).

A maioria das emulsões produzidas pelos micro-organismos avaliados neste estudo foi do tipo Winsor II (A/O). Também foram encontradas emulsões do tipo Winsor I (O/A). A predição da formação de emulsões A/O ou O/A é possível baseada nos conceitos de Bancroft (1913) e Griffin (1949), onde o valor do balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) determina o tipo de emulsão. As diferentes aplicações das moléculas emulsificantes variam de acordo com seus valores de HLB: 3-6, emulsão água/óleo; 7-9, molhabilidade; 8-18, emulsão óleo/água; 3-15, detergência; e 15-18, solubilização. Logo, as moléculas com atividade emulsificante A/O (HLB 3-6) possuem afinidade pela fase oleosa e estabilizam emulsões do tipo água em óleo. Já as moléculas emulsificantes com atividade O/A (HLB 8-18) possuem afinidade pela fase aquosa e estabilizam emulsões do tipo óleo em água (TADROS *et al.*, 2009). Os emulsificantes tendem a promover a dispersão da fase em que não se dissolvem muito bem, ou seja, a fase na qual os emulsificantes são solúveis é a fase contínua (TADROS *et al.*, 2004).

Os conceitos de Bancroft (1913) e Griffin (1949) podem ser fundamentados no efeito Gibbs-Marangoni baseado no fato de que moléculas emulsificantes ao aderirem nas regiões interfaciais devem estar solúveis na fase contínua para que seja gerado um gradiente de tensão e não ocorra a coalescência de gotículas. Se o processo inverso ocorresse a porção solúvel dos emulsificantes estaria dentro das gotas, o que acarretaria na coalescência devido a não formação de um gradiente de tensão interfacial e não geração de um fluxo de líquido na fase contínua (TADROS *et al.*, 2004).

O desequilíbrio na proporção de água e óleo, e o aumento da salinidade, temperatura e pH podem alterar a estabilidade, ocasionar inversão de emulsões e separação das fases. Essas alterações podem resultar em inversões de micelas e na transição de emulsões

do tipo Winsor I para II, ou vice-versa. Em alguns casos, o sistema pode mudar de forma contínua de emulsões ricas em água para uma microemulsões rica em óleo, sem a separação das fases (BELLOCQ *et al.*, 1984).

A observação ao microscópio das emulsões Winsor II revelaram micelas de aspecto regular de superfície. Nas micelas do consórcio PET-DG observou-se além das emulsões regulares, a existência de gotículas com aspecto mucilaginoso. Logo, neste consórcio provavelmente existem linhagens produtoras de emulsificantes poliméricos.

PETBA16 e QUEBA05 produziram emulsões do tipo Winsor I (O/A) com micelas de tamanhos maiores e formação de biofilmes mucilaginosos, típicos de biopolímeros. Polímeros de alto peso molecular, solúveis em meio aquoso, são úteis em estabilizar uma grande variedade de hidrocarbonetos em emulsões O/A. A baixa velocidade de reposição dos surfactantes poliméricos nas regiões interfaciais para manter o equilíbrio de moles de surfactantes por área gera emulsões maiores. Nesse sistema de emulsificação, a porção lipofílica dos polímeros adsorve e ancora na fase de óleo na interface óleo-água e a porção hidrofílica, em contato com a água, forma uma rede de gel forte ou filme em torno de todas as gotículas de óleo. Esse sistema de emulsão possui uma estabilidade excepcional. A camada de gel adsorvido em cada gota de óleo criar uma força repulsiva física importante na estabilidade das emulsões (CHAMANROKH *et al.*, 2008; MAZAHARI ASSADI; TABATABAEE, 2010).

Uma importante aplicação das emulsões que estabilizam moléculas de óleo em água, além de facilitar o processo de degradação, é a utilização em processos de lavagem e retirada de óleo de sedimentos (FRANZETTI *et al.*, 2009; RON; ROSENBERG, 2001).

Nesse estudo as emulsões O/A foram produzidas por linhagens do gênero *Gordonia*. Essa atividade foi potencializada com o passar do tempo, em condição estática, e mostrou a presença de bolhas na interface água-óleo. Lin *et al.* (2005) também observaram emulsões semelhantes com espécies de *Gordonia* durante a degradação de diesel. Esses pesquisadores confirmaram através de microscopia eletrônica de varredura a formação de biofilmes bacterianos na interface água-óleo decorrendo da produção de polissacarídeos.

Uma das limitações associadas à biodegradação de óleo é o fato das células microbianas tenderem a precipitar em sistema aquoso quando a agitação mecânica não é disponível. Essa decantação de células reduz o contacto com os hidrocarbonetos, que normalmente flutuam sobre a superfície aquosa. As linhagens que não possuem flutuabilidade produzem preferencialmente emulsificantes para o meio externo das células para aumentar a biodisponibilidade dessa molécula na fase aquosa. Nessas culturas as emulsificações nos

ensaios de E24 são produzidas pelo sobrenadante e não pela biomassa celular (LIN *et al.*, 2005).

Uma estratégia utilizada por bactérias degradadores de hidrocarbonetos que não possuem motilidade, como o gênero *Gordonia*, foi desenvolver a capacidade de flutuar na direção do substrato oleoso para realizar os processos de biodegradação. Essa propriedade de flutuação é adquirida através da produção de polissacarídeos na parede celular. Esses micro-organismos são capazes de se localizar na interface água-óleo e formar biofilmes bacterianos. Além disso, os polissacarídeos produzidos pelas células microbianas aumentam a hidrofobicidade celular e podem ter estreita relação com a capacidade de degradar hidrocarbonetos (LIN *et al.*, 2005).

Surfactantes poliméricos também são capazes de causar desemulsificação de emulsões água em óleo. Polímeros com altos valores de HLB, ou seja, com um elevado número de grupos hidrófilos, mesmo que tenham baixas massas moleculares, apresentam excelente capacidade desemulsificante (ROODIBARI *et al.*, 2011; ZAKI; ABDEL-RAOUF; ABDEL-AZIM, 1996). Logo, a atividade desemulsificante apresentada pela biomassa das linhagens de *Gordonia* provavelmente está relacionada à produção de polissacarídeos de cadeia longa. Micro-organismos com capacidade de flutuar e com alta hidrofobicidade celular possuem propriedades desemulsificante devido às interações na interface óleo-água (NADARAJAH; SINGH; WARD, 2002).

A associação da atividade desemulsificante com a presença de polissacarídeos na parede celular de células bacterianas do gênero *Gordonia* também foi constatada durante a produção de emulsões pelas culturas do consórcio PET quando crescido sem linhagens desse gênero. Os resultados revelam existir um efeito negativo ocasionado pelos bioemulsificantes poliméricos nas emulsões água-óleo nos ensaios de E24, demonstrando que alguns agentes que podem fazer emulsão de óleo em água removem a água presente em emulsões de água em óleo.

Nesse trabalho foi revelado que alguns emulsificantes com propriedades estruturais peculiares podem ter tanto efeitos de emulsificação como de desemulsificação em diferentes casos. Roodbari *et al.* (2011) também estudaram o efeito desemulsificante de moléculas capazes de formar emulsões óleo em água e demonstraram a aplicação de emulsionantes com alto HLB no processo de retirada de água emulsionada em petróleo.

Os desemulsificantes poliméricos podem ser adsorvidos na interface água/óleo desestabilizando emulsões. Quando essas moléculas são absorvidas na interface água/óleo numerosos grupos funcionais com atividade de superfície, pertencentes às moléculas

desemulsificantes e presentes na parte oleosa, podem penetrar na interface óleo/água e formar uma camada interfacial facilmente rompível (ZAKI; ABDEL-RAOUF; ABDEL-AZIM, 1996). O aumento no grau de polimerização, presença de átomos eletronegativos e cadeias de alcanos com 4-9 átomos de carbono melhora a capacidade de separação de óleo e água dos desemulsificantes (ROODIBARI *et al.*, 2011; ZAKI; ABDEL-RAOUF; ABDEL-AZIM, 1996).

Já em relação à linhagem *Dietzia* PETBA17, a atividade desemulsificante, provavelmente, está relacionada com a produção de lipopeptídeos. O gênero *Dietzia* é conhecido como produtor de moléculas lipopeptídicas com atividade desemulsificantes ligadas a parede celular bacteriana. Esses compostos são formados por um grupo hidrofílico composto por peptídeos e outro hidrofóbico composto por cadeia alifática (HUANG *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2009). Liu *et al.* (2009) demonstraram que diferentes moléculas de lipopeptídeos podem ser sintetizadas de acordo com a composição dos ácidos graxos presentes como fonte de carbono no meio de cultivo. Esses pesquisadores também relataram que a eficiência do tensoativo é dependente da composição, o que torna possível a realização de futuros ensaios para obtenção de moléculas com melhores atividades a partir de modificações nas composições dos meios de cultivo.

Uma emulsão estável é formada quando gotículas são dispersas pela repulsão eletrostática de suas cargas de superfície ou devido à adsorção de moléculas emulsionante na interface óleo/água. Um bom desemulsificante para promover um processo de agregação de gotículas dispersas e desestabilizar emulsões deve possuir três importantes características: boa miscibilidade na fase dispersa, boa difusividade para assegurar uma difusão eficiente para região interfacial e alta atividade de superfície para reduzir o gradiente de tensão interfacial (IVANOV; KRALCHEVSKY, 1997; KIM; WASAN, 1996).

Huang *et al.* (2010) e Liu *et al.* (2009) demonstraram que os lipopeptídeos produzidos por espécies de *Dietzia* são miscíveis e rapidamente dispersos na fase contínua tanto de emulsões água em óleo, como óleo em água. Essas moléculas possuem atividade de superfície elevada e destroem a estabilidade das emulsões. Conseqüentemente, ocorrem os processos de desestabilização e floculação ou coalescência das gotículas com completa separação de fases.

Os processos de desestabilização das emulsões podem ser consequência da neutralização das cargas superficiais das gotículas ou da substituição das moléculas emulsificantes na interface e diminuição do gradiente de tensão (HUANG *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2009). Em situações onde ocorre a depleção de surfactantes no fino filme das gotículas

próximas, ocorre a diminuição do gradiente de tensão, o que acarreta na ausência de fluxo de líquidos na fase contínua. Isto resulta em um fluxo interno de líquido nas gotículas e conseqüentemente sua desestabilização (TADROS *et al.* 2004).

Neste trabalho demonstrou-se a importância de se reunir linhagens bacterianas com metabolismos biossintéticos de surfactantes semelhantes. Em consórcios as moléculas com atividades de superfície devem possuir características compatíveis, com efeito sinérgico durante o processo de emulsificação, além de HLB médio ajustado com a aplicação desejada. No caso de misturas de surfactantes não compatíveis e com HLB muito diferentes, como os encontrados nos intervalos dos emulsificantes com atividade A/O (3-6) e O/A (8-18), pode ocorrer inversão de fase ou desestabilização da emulsão.

Baseando-se no fato de que todos os micro-organismos foram isolados do sedimento do manguezal da Baía de Todos-os-Santos, este ecossistema possui uma comunidade microbiana residente rica em micro-organismos produtores de diferentes SACs. Portanto, a bioestimulação da produção de moléculas com atividade emulsificante *in situ* também consiste em uma alternativa interessante para recuperação desta região contaminada com petróleo.

Na indústria petrolífera durante a produção, o transporte e o refino de petróleo ocorre uma mistura intensa de água com óleo e contaminantes, resultando na formação de emulsões indesejadas. Os desemulsificantes são muito utilizados no processo de retirada de água do óleo. Além de serem aplicados na limpeza de fundo de tanques, no qual a fração pesada do óleo associada a sólidos e água fica impregnada (ABDEL AZIM *et al.*, 2011, BANAT *et al.*, 2010). As principais desvantagens da presença de água no petróleo, que podem chegar a interromper os processos de produção e refino, são diminuir a qualidade do óleo, acelerar o processo de incrustação e corrosão nas instalações, reduzir a capacidade de estocagem, superdimensionar dutos, equipamentos e tubulações, e maior consumo de produtos químicos e energia. Os processos de emulsificação em petróleo são, geralmente, promovidos por emulsificantes naturais de alto ponto de ebulição e alta massa molar, tais como os asfaltenos, as resinas, as bases e ácidos orgânicos, os ácidos naftênicos e carboxílicos, os compostos de enxofre e fenóis. Além dos emulsificantes naturais, outras moléculas emulsificantes podem estar presentes no petróleo, como as adicionadas durante a fase de exploração, como os produtos químicos que são injetados nos poços, os fluidos de complementação e perfuração, os inibidores de corrosão e incrustação (ABDEL AZIM *et al.*, 2011, BANAT *et al.*, 2010; KOKAL, 2002).

Para o processo de transporte de petróleo a quantidade máxima de água permitida é 0,5- 2,0 % e o processo de desestabilização de emulsões é essencial para obtenção de um óleo vendável (ABDEL AZIM *et al.*, 2011, BANAT *et al.*, 2010). Em escala comercial, as emulsões são tratadas por uma combinação de tratamentos físicos e químicos que envolvem centrifugação, tratamentos térmicos ou elétricos, bem como a adição de produtos químicos. Atualmente muitas pesquisas têm sido focadas na busca por biodesemulsificantes capazes de modificar as propriedades das emulsões para recuperação de óleo (NADARAJAH; SINGH; WARD, 2002).

Os SACs de origem microbiana têm demonstrado maior versatilidade do que muitos surfactantes sintéticos auxiliando na remediação tanto *in situ* quanto *ex situ* (MULLIGAN *et al.*, 2005). Os surfactantes sintéticos ainda são os utilizados na indústria do petróleo, para limpeza de derramamentos e recuperação de petróleo de reservatórios. Entretanto, estes produtos podem ser tóxicos ao ambiente e são difíceis de serem biodegradados. Por outro lado, os surfactantes de origem biológica destacam-se pela baixa ou ausente toxicidade, biodegradabilidade e eficácia em amplas faixas de temperatura, pH e salinidade (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Apesar das vantagens relacionadas à aplicação dos SACs, a comercialização e utilização desses compostos de origem microbiana ainda são limitadas devido aos altos custos de produção, recuperação e purificação, que ainda não competem com os surfactantes químicos. A maioria dos biosurfactantes conhecidos é sintetizado por micro-organismos degradando hidrocarbonetos. A utilização de substratos oleosos ao invés de substratos solúveis como, por exemplo, glicerol, glicose, etanol, torna o sistema produtivo mais caro devido aos custos dos meios de culturas e ao fato do processo de recuperação e purificação ser mais difícil e caro comparado ao uso dos outros substratos (MARCHANT; BANAT, 2012; TABATABAEE *et al.*, 2005). Tendo em vista essas limitações, diferentes estratégias estão sendo consideradas como o desenvolvimento de bioprocessos mais eficiente de produção e recuperação, a aplicação de culturas puras com boa atividade de superfície sem a necessidade de purificação, e a utilização de resíduos ou substratos de baixo custo para os processos de produção (BANAT *et al.*, 2010; MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011; MARCHANT; BANAT, 2012).

Nesse estudo, a opção pelo glicerol como fonte de carbono para as bactérias produtoras de tensoativos foi devido ao recente destaque dado a esse composto como fonte de carbono alternativo (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009). O glicerol é um resíduo que tem se acumulado com a produção de biodiesel no Brasil, possui baixo preço e é facilmente

metabolizado por uma grande variedade de bactérias. A comunidade científica tem realizado esforços no sentido de desenvolver tecnologias que sejam capazes de aproveitar essa oferta excessiva de glicerol residual da indústria de combustíveis, agregando valores ao processo e amenizando seus entraves de armazenamento e descarte, uma vez que o glicerol não pode ser lançado diretamente no meio ambiente (MARCHANT; BANAT, 2012; SILVA; MACK; CONTIERO, 2009).

Os SACs de diferentes naturezas químicas obtidas nesse estudo encontram demanda em vários setores industrial e ambiental. É importante destacar que as atividades foram testadas com amostras brutas, o que pode representar uma alternativa economicamente viável para o processo produtivo, e que essas atividades podem ser potencializadas por processos de purificação dessas biomoléculas.

4.5 CONCLUSÕES

A combinação da técnica de enriquecimento associada à DGGE permitiu desvendar a dinâmica da comunidade bacteriana de uma amostra de sedimentos do manguezal da Baía de Todos-os-Santos em resposta a diferentes hidrocarbonetos do petróleo. Partindo dessa estratégia foram selecionadas linhagens de bactérias hidrocarbonoclásticas e produtoras de compostos ativos de superfície.

Ao todo foram isoladas 39 linhagens de bactérias, pertencentes a 20 gêneros e quatro filos: Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes. Foram obtidos quatro consórcios com especificidades para degradar HPAs, petróleo, querosene e hexadecano. Dentre os gêneros encontrados, quatro (*Micrococcus*, *Gordonia*, *Sphingomonas* e *Achromobacter*) foram encontrados em pelo menos dois grupos, revelando que os consórcios compartilharam poucos gêneros, ou seja, cada fonte de hidrocarboneto selecionou gêneros diferentes dentro do *pool* gênico dos sedimentos.

As linhagens produtoras SACs (biossurfactantes, bioemulsificantes e biodesemulsificantes) isoladas neste trabalho são valiosas para aplicações em biorremediação e apresentam uma alta diversidade de gêneros produtores (*Achromobacter*, *Brachybacterium*, *Bhargavaea*, *Curtobacterium*, *Cytophaga*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Leifsonia*, *Mangroveibacter*, *Martellella*, *Mesorhizobium*, *Micrococcus*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*, *Staphylococcus*, *Thalassospira*, e Xanthomonadaceae), o que sugere a produção de moléculas de diferentes classes, possivelmente, até de novas classes de tensoativos, tendo em vista a produção desses compostos por 10 gêneros (*Bhargavaea*, *Brachybacterium*, *Curtobacterium*, *Cytophaga*, *Leifsonia*, *Mangroveibacter*, *Martellella*, *Mesorhizobium*, *Sphingopyxis* e *Thalassospira*) ainda não descritos como produtores de emulsificantes.

A preparação de consórcios bacterianos para produção de compostos tensoativos deve levar em consideração a utilização de linhagens capazes de produzir moléculas compatíveis com o processo de emulsificação para evitar a desestabilização da emulsificação.

Os consórcios e linhagens de bactérias nativas isoladas de sedimentos do manguezal da Baía de Todos-os-Santos são candidatas ideais para retornarem ao manguezal e ajudarem na mitigação da borra oleosa presente nos sedimentos (bioaumentação) e/ou para serem usados como fontes produtoras de compostos ativos de superfície, visando à estimulação do potencial hidrocarbonoclástico da microbiota presente nos sedimentos do manguezal (bioestimulação).

**5 CAPÍTULO 02. IMOBILIZAÇÃO DE CONSÓRCIOS DE BACTÉRIAS
HIDROCARBONOCLÁSTICAS EM ESFERAS DE QUITOSANA PARA
APLICAÇÕES EM PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO**

5.1 INTRODUÇÃO

Os ambientes naturais vêm sofrendo com a poluição decorrente das atividades da indústria petrolífera, que impactam principalmente os ecossistemas costeiros, como os manguezais, afetando toda a biota (DUKE *et al.*, 2000; GENTILI *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2011a). Essas contaminações podem ocasionar efeitos agudos, que resultam em morte, e/ou crônicos, que podem persistir por um longo tempo, reduzir o crescimento de organismos sobreviventes e causar efeitos adversos para o equilíbrio do ecossistema (DUKE *et al.*, 2000).

Muitas técnicas são utilizadas para descontaminação de ambientes poluídos e envolvem processos físicos e/ou químicos. Os processos que utilizam organismos vivos, como micro-organismos, têm sido intensamente pesquisados e recomendados pela comunidade científica como uma alternativa eficaz para o tratamento de ambientes contaminados (ALVAREZ; ILLMAN, 2006; DUKE *et al.*, 2000; GENTILI *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2011a).

Existem vários processos de biorremediação que variam de acordo com o nível de contaminação. Os processos *in situ* são realizados no próprio ambiente e os *ex situ* são realizados em áreas restritas fora do ambiente contaminado. Dentre as técnicas existentes, a bioaugmentação, que consiste na adição de micro-organismos com potencial catabólico específico para recuperação de ambientes contaminados, é uma das técnicas mais amplamente utilizadas (JACQUES *et al.*, 2007; TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010).

A utilização de micro-organismos em consórcios vem se destacando devido à complementaridade metabólica que melhora a eficiência da degradação de hidrocarbonetos e compostos químicos recalcitrantes (JACQUES *et al.*, 2007). Já o uso de micro-organismos imobilizados tem sido explorado devido às suas vantagens quando comparado ao uso de cultura em suspensão. Dentre as vantagens, destacam-se: maior taxa de crescimento, maior estabilidade catalítica, maior tolerância contra grandes concentrações de compostos tóxicos, menor suscetibilidade por contaminação de micro-organismos indesejáveis, possibilidade de reuso, além das células serem mantidas estáveis e ativas por maiores períodos de tempo (CHEN *et al.*, 2007; HSIEH *et al.*, 2008).

Dentre os principais métodos de imobilização, o aprisionamento de células é uma das técnicas mais amplamente utilizada. Neste tipo de imobilização, os micro-organismos ficam aprisionados numa matriz polimérica com poros suficientes para ocorrer a difusão dos substratos, dos gases e dos produtos celulares entre o meio externo e interno da matriz (HSIEH *et al.*, 2008).

Os polímeros naturais mais utilizados como suporte de imobilização são o alginato, a carragenana, a agarose, a quitina e a quitosana (GENTILI *et al.*, 2006). Dentre eles, a quitosana destaca-se por ser bastante disponível, pois é obtida a partir da quitina, um dos polímeros mais abundantes na natureza, além da possibilidade de ser manipulada para produzir materiais de diferentes formatos como esfera, membrana e gel (CHEN *et al.*, 2007).

É importante ressaltar que a dissolução da quitosana é realizada através do processo de protonação da molécula em meio ácido. Nessa condição, esse polímero é capaz de inibir o crescimento de várias espécies de bactérias (BENHABILES *et al.*, 2012). Considerando a utilização de gel na imobilização de células microbianas, o aprisionamento de micro-organismos em quitosana depende da seleção de espécies resistentes. Também é importante selecionar micro-organismos não produtores de enzimas quitinolíticas, a fim de evitar a degradação da matriz (SOMASHEKAR; JOSEPH, 1995).

Esse estudo teve por objetivo validar um protocolo de imobilização em esferas de quitosana, selecionar bactérias hidrocarbonoclasticas e produtoras de compostos ativos de superfície (*Surface Active Compounds*- SACs) compatíveis com esse processo de imobilização, desenvolver um produto e avaliar sua aplicação em biorremediação.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Protocolo para formação de esferas de quitosana

Os ensaios de imobilização foram realizados utilizando uma quitosana da marca Galena com grau de desacetilação de 86,5% cedida pelo Parque de Desenvolvimento Tecnológico do Ceará (PADETEC). Para avaliação da melhor metodologia de produção do gel de quitosana foram testadas a solubilização deste biopolímero na proporção de 3% (m/v) em diferentes concentrações de ácido acético 1 a 5% (v/v), sob agitação de até 4 h, nos valores de pH 3,0 e 5,0 (valor ajustado com adição lenta de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH 1N)). Já para determinação da melhor metodologia de polimerização do gel de quitosana para produção das esferas, os géis foram gotejados utilizando seringas com agulha em soluções de NaOH, pH 12,0, nas concentrações de 4 e 8% (m/v) e em solução de Tripolifosfato de Sódio (TPP) 1 e 2% (m/v), pH 9,0. Após, as esferas produzidas utilizando-se NaOH e TPP permaneceram imersas nas respectivas soluções por 2 h e foram lavadas com água destilada e solução fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) 0,15 M, respectivamente, antes de serem analisadas.

5.2.2 Avaliação da susceptibilidade ao gel de quitosana e ao processo de imobilização.

A seleção de isolados bacterianos passíveis de serem imobilizados em esferas de quitosana foi realizada através de ensaios de resistência a atividade antimicrobiana da solução de quitosana 3% (m/v), nos valores de pH 3,0 e 5,0, bem como as condições de pH utilizadas no processo de imobilização, ou seja, pH 5,0 das soluções de quitosana, pH 9,0 da solução de TPP ou pH 12 da solução de NaOH.

Para realização dos ensaios de resistência, as linhagens de bactérias foram cultivadas em placas com Ágar Triptona Glicose Extrato de Levedura acrescido de NaCl na concentração 2% (m/v) (ATGE-salino) por 48 h a 30 °C. Em seguida, colônias das linhagens bacterianas foram subcultivadas em tubos contendo 5 mL de Triptona Glicose Extrato de Levedura também acrescido de NaCl na concentração 2% (m/v) (TGE-salino). Após 18 h de crescimento a 30 °C, uma alíquota de 100 µL de cada cultura foi transferida para tubos contendo gel de quitosana 3% (m/v) nos valores de pH 3,0 e 5,0, solução de NaCl 0,9% (m/v) pH 5,0 e 12, e solução de TPP 1% (m/v) pH 9,0. Decorridas 3, 6, 9 e 24 h de contato das culturas com a soluções de quitosana, e 3 h de contato em meios de diferentes pHs, foram realizados subcultivos em placas de ATGE-salino, onde se definiu como resistentes os isolados que cresceram nas condições testadas e produziram colônias. Em todos os ensaios foram realizados pelo menos 3 experimentos independentes com duplicatas.

5.2.3 Produção da enzima quitosanase

Para este ensaio, as linhagens de bactérias foram previamente crescidas em placas de ATGE-salino por 48 h a 30 °C e, posteriormente, colônias puras foram cultivadas em caldo TGE-salino por 16 h. Alíquotas de 100 µL dessas culturas foram inoculadas na superfície de placas contendo o meio *Chitosanase-Detection Agar* (CDA). O meio CDA foi preparado de acordo com Cheng e Li (2000), com modificação da concentração de quitosana no meio para 0,1% (m/v). A produção de quitosanase foi confirmada pela verificação de halos de hidrólise ao redor das colônias após incubação a 30 °C por 48 h. Uma linhagem de *Bacillus* sp., produtora de quitosanase foi usada como controle positivo. Foram realizados pelo menos 3 experimentos independentes com duplicatas.

O procedimento de preparação do meio CDA 0,1 % (m/v) foi feito como se segue:

I) Solução de Quitosana

1 g de quitosana em pó foi dissolvido em 200 mL de uma solução de ácido acético 1% (v/v) e deixado sob agitação constante por 2 h;

II) Solução de Minerais:

Foram preparados 300 mL de uma solução de minerais com a seguinte composição por litro: Na_2HPO_4 (1,30 g), KH_2PO_4 (3,0 g), NaCl (0,5 g), NH_4Cl (1,0 g), MgSO_4 (0,24 g) e CaCl_2 (0,01 g);

III) Solução de Quitosana-Minerais

A solução de quitosana (200 mL) foi misturada a solução de minerais (300 mL) e o pH ajustado para 6,5 com gotas de uma solução NaOH 1N. Essa mistura foi esterilizada a 110 °C por 10 min.;

IV) Solução de Agar

Foram preparados 500 mL de Agar 4% (m/v) e esterelizado a 121 °C por 15 min.;

V) Meio CDA 0,1 % (m/v)

A solução de Quitosana-Minerais (500 mL) foi misturada asépticamente à solução de Agar (500 mL) e distribuída em placas de Petri esterilizadas previamente em estufa.

5.2.4 Análise das esferas de quitosana por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras de esferas de quitosana com e sem consórcios compostos pelas cepas bacterianas resistentes imobilizadas foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas. Em seguida, as esferas secas foram metalizadas com uma camada de 15 nm de ouro e visualizadas por MEV (Philips, Modelo ETAX-XC 30, USA). Essa análise foi realizada com o intuito de verificar a presença de células bacterianas dentro das esferas e a formação de poros na superfície com tamanho ideal para promover o aprisionamento celular e uma boa difusão de nutrientes e metabólitos entre o meio externo e interno das esferas (HSIEH *et al.*, 2008).

5.2.5 Imobilização e quantificação da densidade de células bacterianas imobilizadas

As linhagens bacterianas selecionadas foram cultivadas em meio TGE-salino por 24 h, separadamente. Em seguida, as absorbâncias das culturas foram ajustadas para 0,1 a 600 nm. As linhagens formadoras dos consórcios foram cultivadas conjuntamente adicionando-se um inóculo de 3% (v/v), constituído por partes iguais de cada cultura em 35 mL de caldo TGE-salino. Essa cultura cresceu por 20 h até atingir uma absorbância de 1,5 a 600 nm. Uma alíquota de 25 mL da cultura foi centrifugada a 5000 x g por 15 min e o precipitado de células foi ressuscitado em 500 µL de salina. Em paralelo, um gel foi preparado dissolvendo-se o pó de quitosana na proporção 3% (m/v) por 1 h em uma solução de ácido acético 1% (v/v) pH 3,0. Em seguida, os 500 µL contendo a biomassa microbiana do consórcio a ser imobilizado foram transferidos para o gel de quitosana e submetidos à agitação por 3 h.

A solução de quitosana com micro-organismos foi gotejada usando uma seringa com agulha em 200 mL de uma solução de TPP 1% (m/v), pH 9,0, para formação das esferas e aprisionamento das células bacterianas. As esferas permaneceram nessa solução por 3 h para consolidação das ligações cruzadas entre as cadeias de quitosana e, posteriormente, foram lavadas três vezes em 200 mL de uma solução K₂HPO₄ 0,15 M pH 8,0 (HSIEH *et al.*, 2008). Uma massa de 4 g de esferas foi pesada e macerada para realização das contagens. O volume do macerado de esferas foi ajustado para 40 mL com solução de NaCl 0,9% (m/v). Diluições seriadas do macerado foram realizadas e plaqueadas em ATGE-salino para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) e avaliação do processo de imobilização. Todos os ensaios foram realizados 3 vezes com duplicatas.

5.2.6 Avaliação da degradabilidade das esferas de quitosana em água e sedimento

Para o monitoramento da biodegradabilidade natural das esferas de quitosana em água marinha e sedimento de manguezal foram testadas 2 combinações de microcosmos:

1. 50 mL de água do mar + 5,0 g de esferas úmidas de quitosana 3% (m/v);
2. 50 g de sedimento de manguezal + 50 mL de água do mar + 5,0 g de esferas úmidas de quitosana 3% (m/v);

Os ensaios foram realizados em triplicata e a biodegradabilidade das esferas foi acompanhada visualmente.

5.2.7 Efeito das esferas de quitosana sobre a microbiota de sedimento de manguezal

Foram construídos microcosmos com 50 g de sedimento (experimento controle) e 50 g de sedimento adicionado de 5,0 g de esferas úmidas de quitosana. Os microcosmos foram incubados em temperaturas que variaram de 27-30 °C e o efeito da quitosana sobre a comunidade microbiana foi verificado através da contagem de heterotróficos totais, ou UFC, no início do experimento e após 12 dias. Para contagem dos heterotróficos totais, 5,0 g de sedimento de cada tratamento foram retirados, ressuspensos em um volume final de 50 mL e diluídos seriadamente em solução de NaCl 0,9% (m/v). Em seguida, essas diluições foram plaqueadas em ATGE-salino para contagem das UFCs. Os ensaios foram realizados em 3 experimentos independentes com replicatas. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo método de *ANOVA* com o pós-teste de *Tukey* utilizando intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Para as análises estatísticas foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5.0*.

5.2.8 Produção em larga escala de esferas de quitosana

Em paralelo, foi construído e testado em parceria com a empresa EMETECH (Ceará, Brasil) um equipamento (MEQ) para produção em larga escala de esferas de quitosana. A máquina foi desenvolvida pelos pesquisadores envolvidos no projeto. Baseia-se em um sistema automatizado que realiza a mistura do gel de quitosana com a biomassa que será imobilizada e promove o gotejamento controlado na solução coagulante para formação de esferas. O gotejamento ocorre através de bicos de injeção (agulhas) acoplados, que podem ser de diferentes calibres e permitem a produção de esferas de diferentes diâmetros. Para produção em larga escala, o gel de quitosana foi preparado dentro de um contêiner principal da MEQ utilizando misturadores mecânicos acoplados ao equipamento. Essa solução foi gotejada com vazão controlada em um segundo contêiner contendo a solução coagulante e o processo de formação de esferas foi avaliado.

5.2.9 Determinação do tempo de prateleira de esferas de quitosana com consórcios bacterianos imobilizados

Os testes de prateleira foram realizados para avaliar o efeito do armazenando das esferas a 8 °C. A cada 15-30 dias, 4 g de esferas de quitosana com um consórcio bacteriano imobilizado foram retiradas, maceradas e o volume complementado para 40 mL. Realizou-se a quantificação da biomassa dentro das esferas através da diluição seriada desse macerado em solução de NaCl 0,9% (m/v) e plaqueamento em ATGE-salino para realização da contagem das UFCs. Todas as contagens de UFCs foram realizadas em triplicadas. Os dados das contagens foram expressos em escala logarítmica e submetidos à análise de variância pelo método de *ANOVA* com o pós-teste de *Tukey* utilizando intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Para as análises estatísticas foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5.0*.

5.2.10 Ensaio de aplicação in situ de esferas de quitosana com e sem consórcios bacterianos imobilizados em microcosmos utilizando sedimento de manguezal contaminado com petróleo

5.2.10.1 Coleta de sedimento e montagem dos microcosmos

A coleta de sedimentos contaminados do manguezal da Baía de Todos-os-Santos foi realizada utilizando-se um testemunho de 30 cm de comprimento por 5 cm de diâmetro. As amostragens de sedimentos foram realizadas aleatoriamente em vários pontos visivelmente contaminados com borras oleosas em uma área de 100 m². Cada testemunho foi dividido em três porções: 0-10 cm, 10-20 cm e 20-30 cm (FIGURA 5.1).



Figura 5.1- Coleta de sedimento do manguezal da Baía de Todos-os-Santos, Bahia e representação das três porções: 0-10 cm, 10-20 cm e 20-30 cm.

Foram coletados sedimentos suficientes para preencher 64 provetas de vidro de 30 x 5 cm. As amostras coletadas foram transportadas até o Laboratório de Simulação de Processos de Biorremediação, construído próximo da área de coleta no manguezal da Baía de Todos-os-Santos. Em seguida, as porções de 0-10 cm, 10-20 cm e 20-30 cm dos testemunhos foram homogeneizadas separadamente e utilizadas para preencher as provetas e compor os microcosmos, respeitando a estratificação do testemunho. Essa etapa de homogeneização por extrato de sedimento foi necessária porque a borra oleosa presente nesta área do manguezal se distribui de forma difusa tanto horizontal quanto verticalmente.

No fundo de cada proveta foi adicionado uma tela fina para fixar o sedimento e ao mesmo tempo permitir a entrada de água durante o processo de simulação de maré. As provetas após montadas foram fixadas em suportes de madeira com capacidade para 8 provetas e distribuídas em 8 aquários (FIGURA 5.2).



Figura 5.2- Aspecto dos aquários usados para montagem dos microcosmos nos ensaios de biorremediação utilizando sedimento de manguezal contaminado com borra oleosa.

Todos os aquários foram preenchidos com água do próprio estuário de modo a simular as condições de maré. Os aquários eram cheios às 7 h com 22 litros de água, de modo que os sedimentos eram banhados de baixo para cima cobrindo toda a extensão da proveta, às 17 h, os aquários eram esvaziados deixando água suficiente para cobrir a base dos sedimentos. Os processos de preenchimento e esvaziamento dos aquários foram realizados de forma gradual e diariamente. Em cada simulação de maré um pouco de água era adicionada na parte superior para umedecer as camadas superficiais dos sedimentos.

Os aquários permaneceram 24 h em repouso após montagem para ocorrer o processo de sedimentação no interior das provetas. Em seguida, foram testadas três condições experimentais:

1. Sedimento (Atenuação Natural): Aquários 1, 2 e 3 (triplicata);
2. Sedimento + esferas de quitosana: Aquários 4 e 5 (duplicata);
3. Sedimento + esferas de quitosana com consórcio bacteriano PET: Aquários 6, 7 e 8 (triplicata).

Uma massa de 20 g de esferas de quitosana úmida com e sem o consórcio de bactérias foi adicionada na parte superficial dos sedimentos nas provetas desses tratamentos.

As análises foram feitas imediatamente após a montagem dos microcosmos, no tempo 0 e após 7, 15, 30, 60 e 90 dias. Em cada um desses dias era retirada uma proveta de cada tratamento e os sedimentos usados para contagem do número de bactérias heterotróficas totais, determinação de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP) e avaliação da estrutura da comunidade bacteriana por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis-DGGE*).

5.2.10.2 Determinação do número de bactérias heterotróficas totais

A contagem de bactérias heterotróficas totais foi realizada pela técnica de microgota (ROMEIRO, R.S., 2008). Nesse procedimento, 4 g de sedimentos foram suspensos em 40 mL de solução de NaCl 0,9% (m/v) esterilizada e homogeneizadas vigorosamente. Em seguida, essas suspensões foram diluídas seriadamente até 10^{-7} e alíquotas de 10 μ L foram inoculadas na superfície de meio ATGE-salino, em quadruplicatas. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 48 h e, em seguida, as colônias foram contadas e os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/g de sedimento. Os dados das contagens foram expressos em escala logarítmica e submetidos à análise de variância pelo método de *ANOVA* com o pós-teste de *Tukey* utilizando intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Para as análises estatísticas foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5.0*.

5.2.10.3 *Análise do perfil e quantidade de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP)*

As análises de HTP foram feitas no Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO) da Universidade Federal da Bahia-UFBA. As amostras de sedimentos provenientes dos aquários foram liofilizadas. Em seguida, uma massa de 10 g foi utilizada para extração em sistema SOXHLET por 4 h utilizando 150 mL de uma mistura de diclorometano/hexano 1:1 (v/v). O volume dos extratos obtidos foi reduzido para 2 mL em rotaevaporador. As frações dos alifáticos e aromáticos foram separadas através de colunas *clean up* e, posteriormente, concentradas para 1 mL em um concentrador de célula fechada do tipo *Kuderna Danish*. O concentrado final foi injetado em uma coluna de fase estacionária DB-5 de 30 m instalada em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (CG/MS) Varian Saturn 2000.

Foram quantificados e expressos em mg/Kg de sedimento seco os n-alcenos de C10 a C40. Os valores foram analisados reunidos nas seguintes frações: frações 2 (C10-16), 3A (C16-23), 3B (C23-34) e 4 (C34-40) dos HTP. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo método de *ANOVA* com o pós-teste de *Tukey* utilizando intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Para as análises estatísticas foi utilizado o programa *GraphPad Prism* 5.0.

5.2.10.4 *Avaliação da dinâmica das comunidades bacterianas dos microcosmos por DGGE*

Para as análises de DGGE, 0,5 g de sedimentos de cada tratamento foram usados para extração de DNA metagenômico usando o kit de extração de DNA *PowerSoil™ DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories Inc., USA). Antes da extração de DNA, as amostras de sedimentos foram homogeneizadas assepticamente por período e condição experimental. A qualidade e quantidade de DNA extraído foram analisadas em *Nanodrop®* ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE, EUA). As amostras de DNA foram armazenadas em freezer a -20 °C.

A região hipervariável v3 do gene codificador para o rRNA16S do DNA foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction-PCR*) usando os iniciadores GC-338F (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GGG GCA GCG CGG GGG ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') (LANE, 1991) e 518R (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993). As reações de

PCR foram realizadas em um volume final de 30 μ L, contendo 10 ng de DNA molde, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 3,0 mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 0,5 μ M de cada iniciador e 1,0 unidade de Taq DNA polimerase (MBI Fermentas Inc., Amherst, New York, EUA). As amplificações foram realizadas em um termociclador (Eppendorf AG 22.331; Eppendorf, Hamburgo, GER) programado para uma etapa de desnaturação inicial (4 min a 94 °C), seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 56 °C e 2 min a 72 °C. O último ciclo foi seguido por uma extensão final de 10 min a 72 °C. A amplificação do gene de interesse foi verificada por eletroforese em agarose 2% (m/v) corada com SYBR® *Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, Eugene, OR, EUA).

A DGGE foi realizada no *D-code™ Universal Mutation Detection system* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Um volume de 15 μ L de cada produto da PCR foi misturado com tampão de amostra na concentração 3:1 (produto de PCR : tampão de amostra) e aplicadas no gel de poliacrilamida 8% (m/v), contendo um gradiente vertical de desnaturação de uréia-formamida de 35-65%. A concentração 100% de desnaturação foi definida como uréia 7 M e 40% (v/v) formamida (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993). A eletroforese foi realizada em uma tensão constante de 200 V por 4 h a uma temperatura de 60 °C. Os géis foram corados durante 1 h em 0,5 X TAE contendo 1 X do corante SYBR® *Green I* (Invitrogen, EUA) e fotografados sob iluminação UV. Todas as imagens foram analisadas utilizando-se o Software *BioNumerics* (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica) com algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*) e coeficiente de similaridade Jaccard. Foram realizadas 3 análises de DGGE independentes com duplicadas.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Protocolo para produção de esferas de quitosana

O pó de quitosana foi bem dissolvido nas soluções de ácido acético (1 a 5%), apenas na faixa de pH 2,5-3,0. Quando se tentou usar tampão acetato de sódio pH 5,0 nas diferentes concentrações, a quitosana não se dissolveu completamente, mesmo após 4 horas de agitação. Portanto, o gel de quitosana foi preparado com ácido acético 1% pH 2,5-3,0.

Uma alternativa desenvolvida para solubilização da quitosana em pH 5,0 foi dissolver este biopolímero em solução de ácido acético 1% (v/v) pH 3,0 e, posteriormente, ajustar o pH para 5,0 gotejando uma solução de NaOH 1% (m/v). Esse procedimento de ajuste

de pH para 5,0 foi realizado visando minimizar os efeitos adversos da forte acidez (pH 3,0) nas células bacterianas no momento da imobilização.

Baseado nos resultados obtidos, os procedimentos de solubilização da quitosana 3% (m/v) em solução de ácido acético 1% (v/v) pH 3,0 e de formação de gel com ajuste de pH para 5,0 foram escolhidos para serem avaliados no processo de gotejando em diferentes soluções coagulantes visando a produção de esferas.

Os resultados dos experimentos de coagulação do gel de quitosana revelaram que tanto as soluções de NaOH (4 ou 8%) quanto tripolifosfato (TPP) a 1% foram eficientes em coagular o gel de quitosana para produção de esferas. As esferas obtidas com qualquer um dos coagulantes apresentaram excelentes propriedades mecânicas, isto é, não se desmancharam quando submetidas à agitação orbital a 150 rpm durante 30 dias de ensaio.

5.3.2 Avaliação da susceptibilidade ao gel de quitosana e ao processo de imobilização.

Os testes que avaliaram a viabilidade das linhagens de bactérias ao contato com o gel de quitosana 3%, nos pH 3,0 e 5,0, revelaram que das 39 linhagens candidatas a imobilização, 31 permaneceram viáveis até 6h de contato com o gel de quitosana e que apenas 17 estavam viáveis com 24 h de contato (TABELA 5.1). Logo, o processo de imobilização da biomassa de bactérias em esferas de quitosana não deve durar mais do que 6 h mesmo para as linhagens de bactérias resistentes. Esse tempo deverá ser suficiente para proceder à homogeneização da biomassa bacteriana no gel de quitosana e a subsequente coagulação dessa mistura para a obtenção das esferas.

Os resultados demonstram que a resistência dos micro-organismos ao gel de quitosana 3% (m/v) não foi influenciada pelo pH (3,0 e 5,0). Portanto, o procedimento foi padronizado para usar ácido acético 1% (m/v) pH 3,0.

As linhagens bacterianas que não suportaram o contato de 3h com o gel de quitosana 3% (m/v) em pH 5,0 sobreviveram nas soluções salinas com esse pH (TABELA 5.2), demonstrando que essas bactérias foram mortas pelo efeito da quitosana e não do pH.

Os testes que analisaram a resistência das linhagens de bactérias aos pHs das soluções coagulantes, isto é, pH 9,0 do TPP e pH 12,0 do NaOH, revelaram que todos as linhagens resistiram a solução de TPP 1% pH 9,0, enquanto apenas 50% suportaram a solução com pH 12,0 (TABELA 5.2). Considerando que a coagulação em solução de TPP ocasionou menos impacto aos membros dos consórcios bacterianos esta foi escolhida como solução coagulante em detrimento da solução de NaOH.

Tabela 5.1- Avaliação da resistência dos isolados bacterianos ao gel de quitosana em pH 3,0 e 5,0.

Isolados	Tempo de contato com gel de Quitosana 3% (m/v)							
	3 h		6 h		9 h		24 h	
	pH 3,0	pH 5,0	pH 3,0	pH 5,0	pH 3,0	pH 5,0	pH 3,0	pH 5,0
HEXBA 1	-	-	-	-	-	-	-	-
HEXBA 2	+	+	+	+	+	+	+	+
HEXBA 3	+	+	+	+	+	+	-	-
HEXBA 4	+	+	+	+	+	+	+	+
HEXBA 5	+	+	+	+	+	+	-	-
HEXBA 6	+	+	+	+	+	+	-	-
HEXBA 7	+	+	+	+	+	+	+	+
QUEBA 1	+	+	+	+	+	+	+	+
QUEBA 2	+	+	+	+	+	+	+	+
QUEBA 3	+	+	+	+	+	+	+	+
QUEBA 4	-	-	-	-	-	-	-	-
QUEBA 5	+	+	+	+	+	+	+	+
QUEBA 6	+	+	+	+	-	-	-	-
QUEBA 7	-	-	-	-	-	-	-	-
QUEBA 8	+	+	+	+	+	+	+	+
HPABA 1	+	+	+	+	+	+	+	+
HPABA 2	+	+	+	+	+	+	+	+
HPABA 3	+	+	+	+	+	+	+	+
HPABA 4	+	+	+	+	+	+	+	+
HPABA 5	-	-	-	-	-	-	-	-
HPABA 6	+	+	+	+	+	+	+	+
HPABA 7	+	+	+	+	+	+	+	+
PETBA 1	+	+	+	+	+	+	+	+
PETBA 2	-	-	-	-	-	-	-	-
PETBA 3	+	+	+	+	+	+	-	-
PETBA 4	+	+	+	+	-	-	-	-
PETBA 5	-	-	-	-	-	-	-	-
PETBA 6	+	+	+	+	+	+	-	-
PETBA 8	+	+	+	+	+	+	+	+
PETBA 9	+	+	+	+	+	+	-	-
PETBA 10	+	+	+	+	+	+	-	-
PETBA 11	+	+	+	+	+	+	-	-
PETBA 12	-	-	-	-	-	-	-	-
PETBA 13	+	+	+	+	+	+	-	-
PETBA 14	+	+	+	+	+	+	-	-
PETBA 15	+	+	+	+	+	+	+	+
PETBA 16	+	+	+	+	+	+	-	-
PETBA 17	-	-	-	-	-	-	-	-
PETBA 19	+	+	+	+	+	+	-	-

Legenda: + Resistente - Susceptível

Tabela 5.2- Avaliação da resistência dos isolados bacterianos ao contato de 3 h em soluções de NaCl 0,9% (m/v) nos valores de pH 5,0 e 12 e solução de TPP 1% (m/v) pH 9,0.

Isolados Bacterianos	Solução de NaCl 0,9% (m/v)		Solução de TPP 1% (m/v) pH
	pH 5,0	pH 12	9,0
HEXBA 1	+	+	+
HEXBA 2	+	+	+
HEXBA 3	+	+	+
HEXBA 4	+	-	+
HEXBA 5	+	+	+
HEXBA 6	+	+	+
HEXBA 7	+	+	+
QUEBA 1	+	-	+
QUEBA 2	+	-	+
QUEBA 3	+	-	+
QUEBA 4	+	-	+
QUEBA 5	+	+	+
QUEBA 6	+	-	+
QUEBA 7	+	-	+
QUEBA 8	+	-	+
HPABA 1	+	+	+
HPABA 2	+	+	+
HPABA 3	+	+	+
HPABA 4	+	+	+
HPABA 5	+	+	+
HPABA 6	+	+	+
HPABA 7	+	+	+
PETBA 1	+	-	+
PETBA 2	+	-	+
PETBA 3	+	-	+
PETBA 4	+	-	+
PETBA 5	+	-	+
PETBA 6	+	+	+
PETBA 8	+	-	+
PETBA 9	+	-	+
PETBA 10	+	-	+
PETBA 11	+	-	+
PETBA 12	+	-	+
PETBA 13	+	+	+
PETBA 14	+	-	+
PETBA 15	+	+	+
PETBA 16	+	+	+
PETBA 17	+	+	+
PETBA 19	+	+	+

Legenda: + Resistente - Susceptível

Baseando-se nos resultados de validação do protocolo de imobilização, a metodologia definitiva consistiu na dissolução da quitosana em solução de ácido acético 1% (m/v) pH 3,0, para a adição da biomassa microbiana composta pelas cepas resistentes ao processo, e gotejamento dessa mistura em solução de TPP 1% (m/v) pH 9,0 para obtenção das esferas com as células aprisionadas. Nessas condições foram obtidas esferas uniformes, com diâmetro médio de 2,0 mm (FIGURA 5.3).

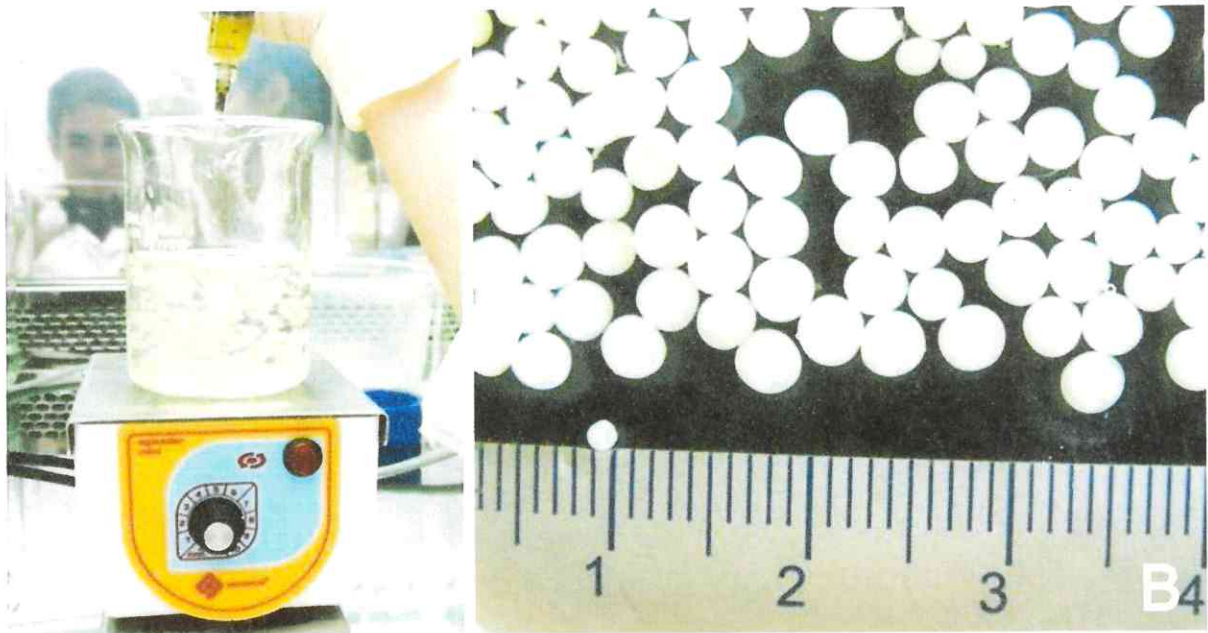


Figura 5.3- Formação (A) e aspecto morfológico de esferas de quitosana com consórcio de microorganismos imobilizados (B).

5.3.3 Produção de quitosanase

Os ensaios para verificação da produção da enzima quitosanase demonstraram que nenhuma linhagem bacteriana foi capaz de produzir esta enzima, nas condições experimentais testadas (FIGURA 5.4). Apenas o controle positivo realizado com uma linhagem de *Bacillus* sp. foi capaz de degradar a quitosana.

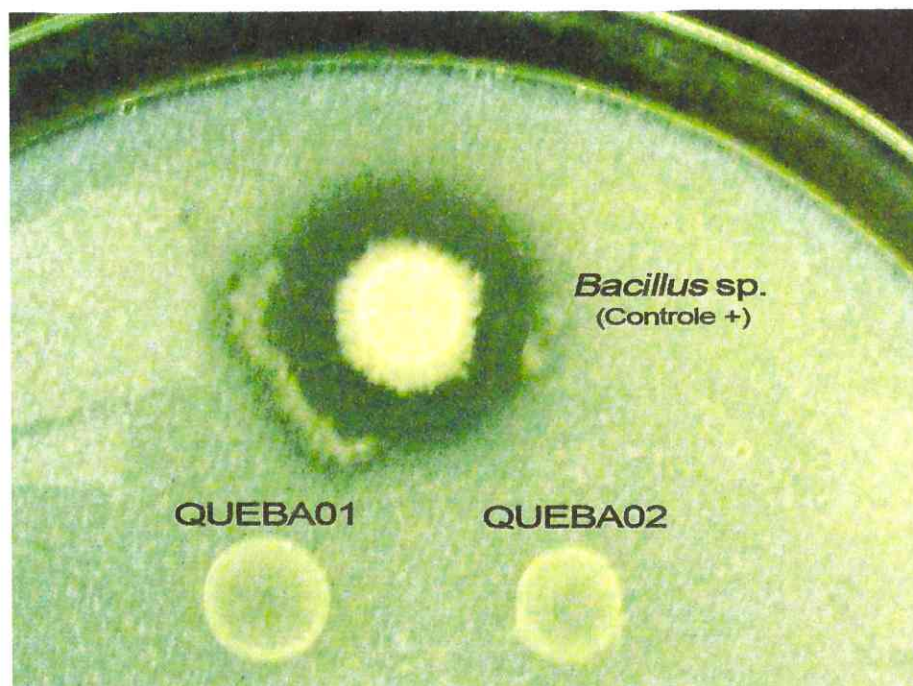


Figura 5.4- Demonstração do resultado negativo de dois isolados (QUEBA01 e QUEBA02) analisados para produção de quitosanase e controle positivo utilizando uma linhagem de *Bacillus* sp.

Assim, as linhagens de bactérias hidrocarbonoclasticas, resistentes a quitosana, não produtoras de enzimas quitinolíticas, e que suportaram a variação de pH (3-12) do processo de imobilização são as candidatas ideais para imobilização nesse biopolímero e utilização no tratamento dos sedimentos do manguezal da Baía de Todos-os-Santos.

5.3.4 Análise das esferas de quitosana por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Definido o melhor processo de imobilização e os micro-organismos candidatos a serem imobilizados realizaram-se análises das esferas contendo os consórcios imobilizados por MEV. As imagens obtidas por MEV (FIGURA 5.5) mostraram a porosidade uniforme das esferas, com diâmetro de $3,67 \pm 1,3 \mu\text{m}$ (FIGURA 5.6). A visão do interior das esferas mostrou que a superfície interna da matriz é rugosa e forma depressões que facilitam a colonização da biomassa microbiana.

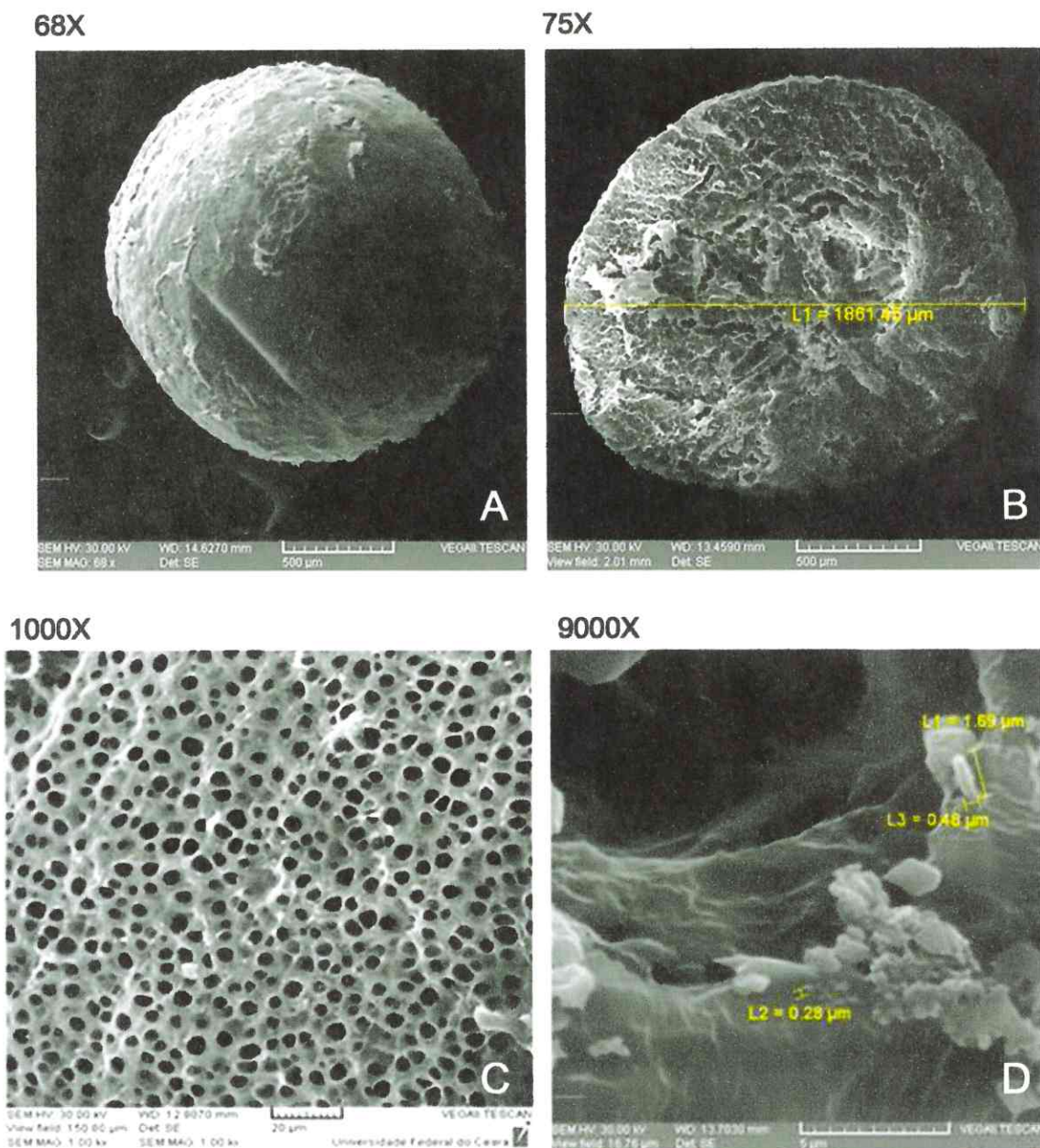


Figura 5.5- Aspecto das esferas de quitosana (A), aspecto do interior das esferas (B), poros presentes na superfície das esferas (C) e aspecto das células bacterianas imobilizadas no interior das esferas (D).

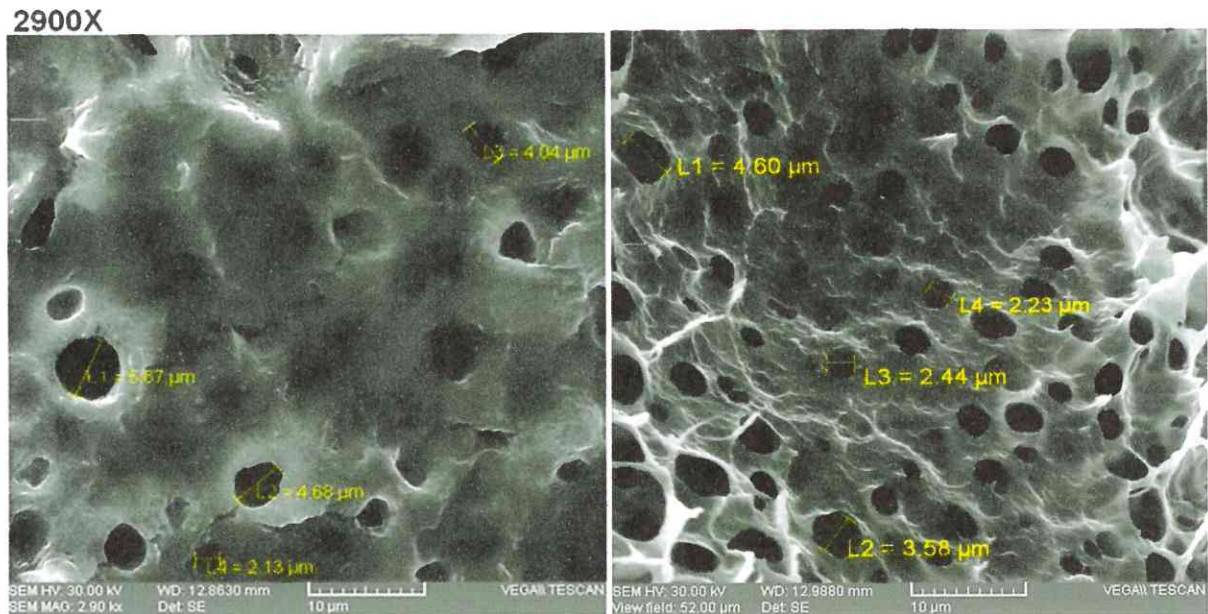


Figura 5.6- Aspecto da superfície das esferas de quitosana evidenciando o tamanho dos poros.

5.3.5 Imobilização e quantificação da densidade de células bacterianas imobilizada

O gotejamento dos 25 mL de solução de quitosana rendeu em torno de $11,52 \pm 1,3$ g de massa úmida de esferas em um volume de $11,57 \pm 2,0$ mL. Cada esfera de quitosana de 2,0 mm de diâmetro pesou em torno de $0,01 \pm 0,002$ g, portanto, 1,0 g de esferas úmida contém cerca de 100 esferas, que preenchem juntas um volume de 1,0 mL.

A contagem de UFCs na cultura centrifugada (25 mL) para recuperação de células e utilização no processo de imobilização foi em média de $2,40 \times 10^9$ UFC/mL. Após o gotejamento dos 25 mL de gel de quitosana com biomassa microbiana para formação das esferas e imobilização das células foi encontrada uma quantidade média de $2,25 \times 10^9$ UFC/g de esferas. Logo, a biomassa do consórcio bacteriano aprisionada por esfera de quitosana foi aproximadamente $2,25 \times 10^7$ UFC/esfera de quitosana. Esses resultados demonstram o sucesso do processo de imobilização de células bacterianas em esferas com uma densidade final elevada e apropriada para estudos de biorremediação.

5.3.6 Avaliação da degradabilidade das esferas de quitosana em água e sedimento

Os testes de avaliação da degradabilidade natural das esferas de quitosana revelaram que elas foram totalmente decompostas a partir de 12 dias mergulhadas em água do mar ou enterradas em sedimentos estuarinos umedecidos com água marinha. Esses resultados foram importantes para mostrar primeiro, que as esferas são biodegradadas naturalmente pela microbiota da água e de sedimentos, e segundo, que o tempo que leva para as esferas serem decompostas serve para proteger e dar tempo para que a microbiota imobilizada dentro das esferas se adapte as condições do ambiente *in situ*.

5.3.7 Efeito das esferas de quitosana sobre a microbiota de sedimento de manguezal

Para saber se a quitosana poderia causar alguma efeito negativo sobre a microbiota nativa do manguezal foram feitas contagens de bactérias heterotróficas totais dos sedimentos antes e após 12 dias de semeadura das esferas de quitosana. Os resultados revelaram um efeito prebiótico da quitosana na comunidade bacteriana dos sedimentos, expressado pelo aumento significativo ($p < 0,05$) do número de unidades formadoras de colônias que passou de $4,5 \times 10^6$ para $1,10 \times 10^8$ UFC/g sedimentos. A contagem de colônias no controle após 12 dias foi $2,85 \times 10^6$ UFC/g, isto é, estatisticamente igual ao valor inicial (FIGURA 5.7).

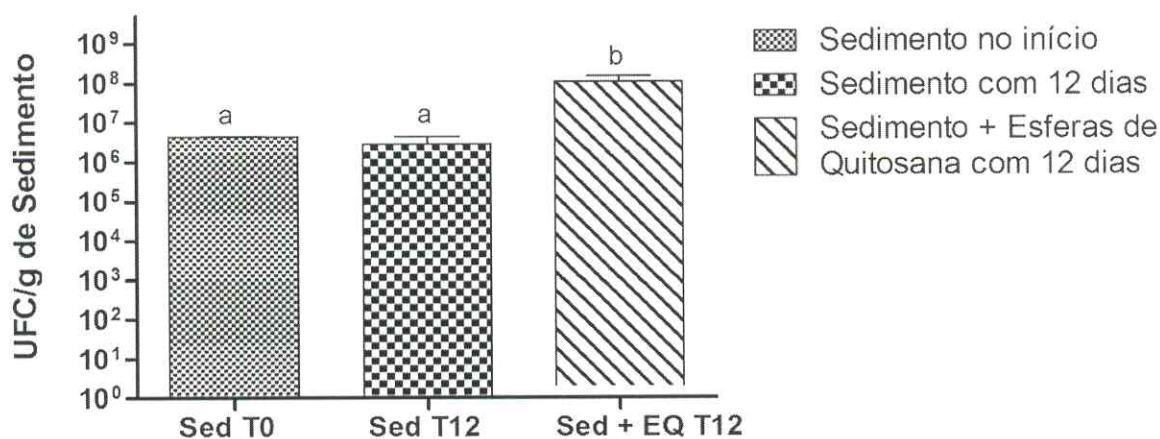


Figura 5.7- Efeito da decomposição das esferas de quitosana nas comunidades microbianas de sedimento de manguezal. Letras diferentes entre colunas demonstram diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p < 0,05$). O teste estatístico utilizado foi a análise de variância com um pós-teste de Tukey.

5.3.8 Produção em larga escala de esferas de quitosana

O escalonamento da produção de esferas na máquina construída para essa finalidade (FIGURA 5.8) mostrou que é possível obter uma tonelada de esferas de quitosana em 22 ciclos de produção nesse sistema que utiliza 2 tonéis de 50 L de gel de quitosana. Esse equipamento é composto por um sistema de mistura automática e de cabeçotes injetores, que dispensam o gel no tanque de coagulação. Através do sistema de cabeçotes é possível a formação de esferas com diferentes diâmetros, com ou sem revestimentos múltiplos. Esse processo representa uma inovação e permite a produção de esferas com polímeros mistos, como quitosana e alginato, o que amplia as possibilidades de aplicações desses polímeros e facilita o processo de imobilização de micro-organismos, enzimas e nutrientes.

O próximo passo será investir na produção em larga escala dos consórcios para imobilização e produção dos biomateriais visando futuras aplicações desses produtos em campo.



Figura 5.8- Máquina de produção em maior escala de esferas de quitosana (MEQ) (A), detalhe dos cabeçotes injetores (B) e aspecto morfológico das esferas produzidas (C).

5.3.9 Determinação do tempo de prateleira de esferas de quitosana com consórcios bacterianos imobilizados

Os resultados dos ensaios de tempo de prateleira demonstraram que a biomassa bacteriana permaneceu viável no interior das esferas de quitosana após 120 dias de armazenamento a 8 °C (FIGURA 5.9).

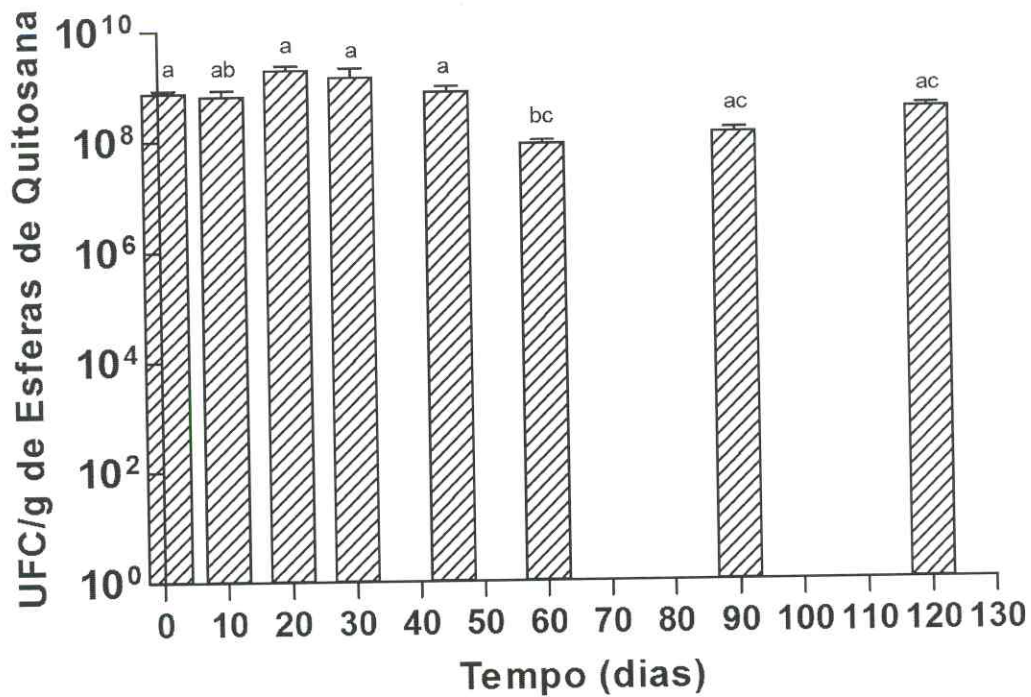


Figura 5.9- Manutenção da viabilidade de células bacterianas imobilizadas nas esferas de quitosana no decorrer do tempo de armazenamento. Letras iguais entre as colunas significam resultados estatisticamente iguais ($p > 0,05$), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com um pós-teste de Tukey.

5.3.10 Ensaio de aplicação *in situ* de esferas de quitosana com e sem consórcios de microorganismos imobilizados em microcosmos de sedimentos do manguezal da Baía de Todos-os-Santos

5.3.10.1 Avaliação do número de bactérias heterotróficas totais

Os resultados do monitoramento das populações de bactérias heterotróficas totais provenientes dos três tratamentos estão representados na Figura 5.10.

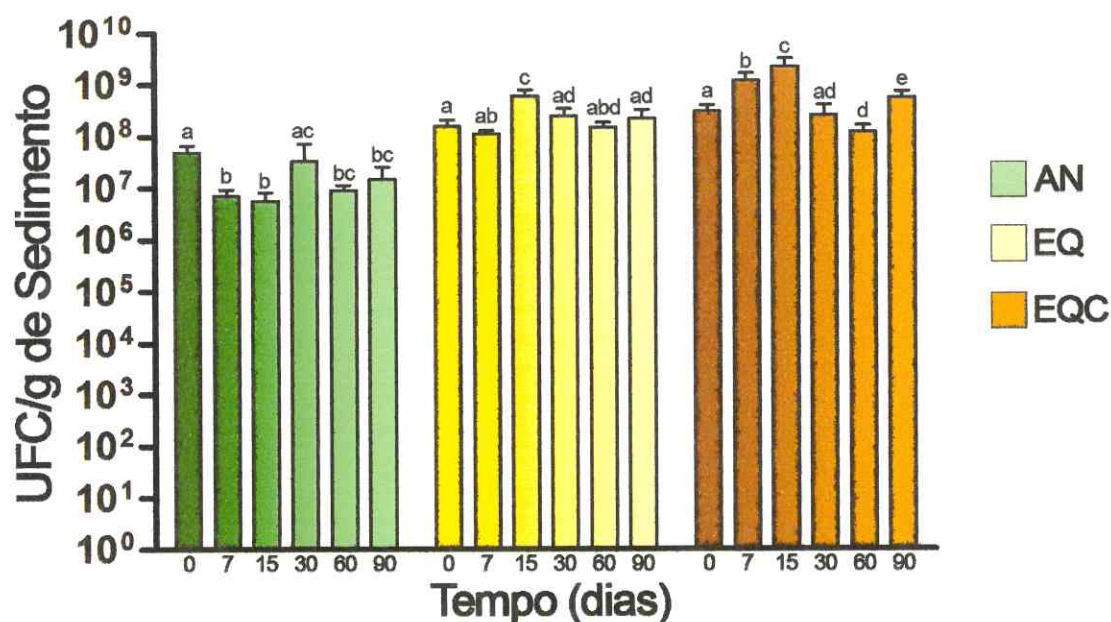


Figura 5.10- Quantificação de bactérias heterotróficas totais em microcosmos nas condições de biorremediação: atenuação natural (AN), esferas de quitosana (EQ) e esferas de quitosana com consórcio bacteriano imobilizado (EQC). Letras diferentes entre as colunas em cada tratamento demonstram diferenças estatísticas entre os tempos ($p < 0,05$), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com um pós-teste de Tukey.

Na condição de atenuação natural (AN) observou-se uma redução significativa do número de bactérias totais nos primeiros 15 dias do experimento. Com 30 dias a contagem de bactérias mostrou que a comunidade havia se recuperado e voltado ao patamar inicial. Depois de 30 dias, a densidade de células se estabilizou em torno de 10^7 UFC/g até 90 dias.

Nos microcosmos que receberam esferas de quitosana (EQ) e esferas de quitosana com bactérias imobilizadas (EQC) foram observados um aumento expressivo da carga bacteriana dos sedimentos até 15 dias, com destaque para condição EQC que apresentou o maior valor de UFC/g e um aumento crescente de células microbianas. No período de 15-30 dias observou-se uma queda no número de células em ambos os microcosmos, seguido de estabilização até 90 dias na condição EQ. Já no microcosmo EQC, a estabilização após a referida queda durou até 60 dias, seguido de um aumento significativo da carga microbiana até 90 dias.

5.3.10.2 *Análise dos hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP) nos microcosmos*

As análises das frações 2 (C10-16), 3A (C16-23), 3B (C23-34) e 4 (C34-40) dos HTP nos diferentes tratamentos de biorremediação demonstraram que 90 dias não foram suficientes para se detectar reduções significativas ($p < 0,05$) dos hidrocarbonetos (FIGURA 5.11), provavelmente, devido à baixa concentração (valor máximo de $\cong 900$ mg/Kg ou 0,09%), a natureza recalcitrante das frações de HTP nos sedimentos utilizados, e a fatores limitantes como a biodisponibilidade dos poluentes e/ou a quantidade de oxigênio.

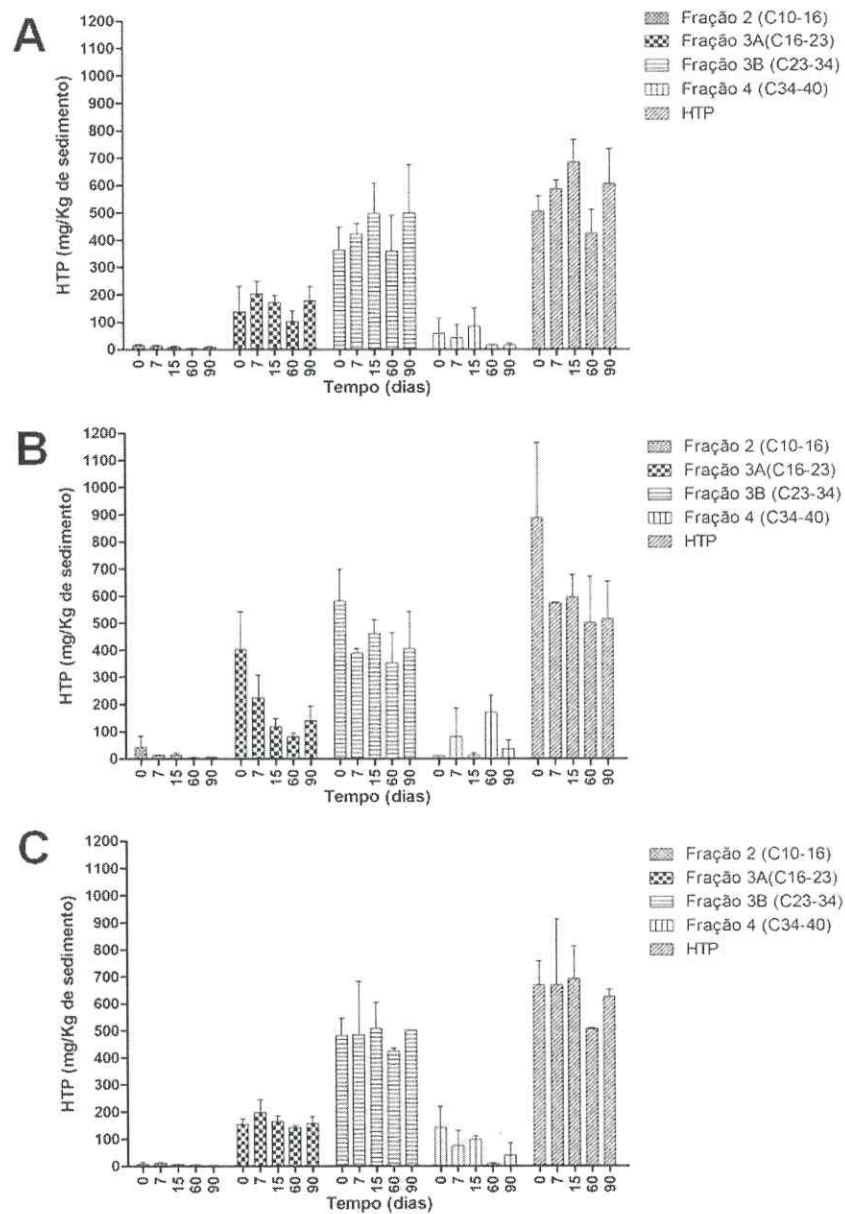


Figura 5.11- Análise das concentrações das frações 2, 3A, 3B e 4 dos HTP nos tratamentos de biorremediação: Atenuação Natural (A), Esfera de quitosana (B) e Esfera de quitosana com consórcio bacteriano (C). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tempos em cada grupo ($p < 0,05$) utilizando análise de variância com pós-teste de Tukey.

5.3.10.3 *Análise da dinâmica da comunidade bacteriana nos microcosmos por DGGE*

As extrações de DNA metagenômico utilizando o kit de extração DNA *PowerSoil™ DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories Inc., USA) foram realizadas com sucesso e apresentaram quantidade e qualidade satisfatória quando analisadas por espectrofotometria utilizando *Nanodrop®* ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE, EUA). Os tubos e luvas utilizadas durante o processo de extração apresentaram-se bastante impregnados com petróleo, evidenciando o grau de contaminação das amostras de sedimento do manguezal da Baía de Todos-os-Santos (FIGURA 5.12).

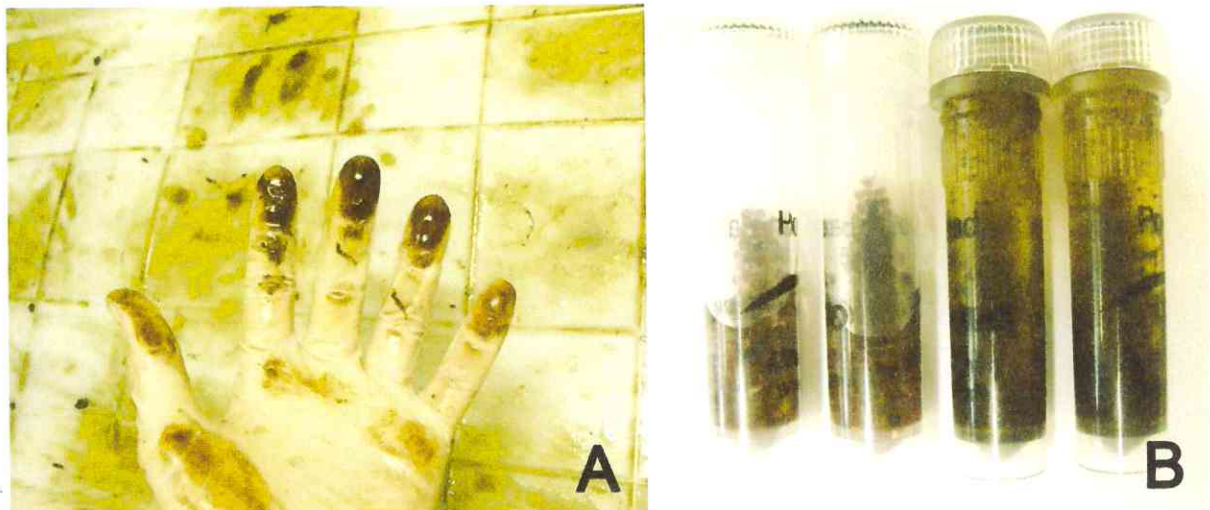


Figura 5.12- Aspecto do material utilizado no processo de extração do DNA metagenômico das amostras de sedimento de manguezal contaminadas com petróleo. Aparência das luvas utilizadas (A) e dos tubos de extração de DNA (B).

Todas as reações de PCR foram amplificadas com sucesso e utilizadas para análise por DGGE. O gel da corrida de eletroforese da DGGE, a partir das condições de microcosmos testadas no decorrer do tempo, está apresentado na Figura 5.13.

Para facilitar a apresentação dos resultados foram utilizadas as seguintes abreviações para representar as condições experimentais: AN (atenuação natural), EQ (esferas de quitosana) e EQC (esferas de quitosana com consórcio bacteriano imobilizado) seguido pelo tempo de coleta nos microcosmos.

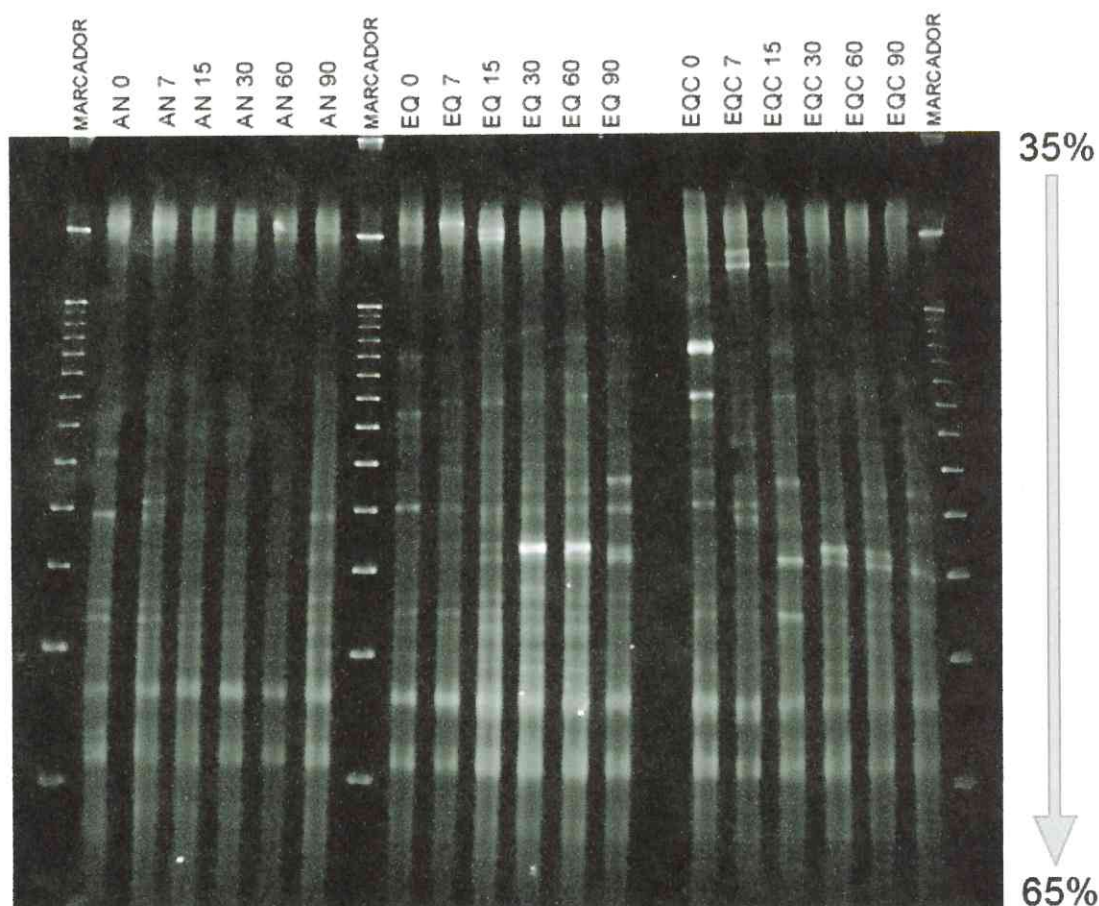


Figura 5.13- Imagem do gel de DGGE com gradiente de desnaturação 35-65% utilizando as reações de PCR dos diferentes tratamentos de biorremediação. As amostras estão representadas por AN (Atenuação Natural), EQ (Esfera de quitosana) e EQC (Esfera de quitosana com consórcio bacteriano) seguido pelo tempo de coleta nos microcosmos. Foi utilizado o marcador de 50 bp DNA Step Ladder, G4521 (Promega Corporation, USA).

O gel foi analisado no programa BioNumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica) para normalização da mobilidade e marcação das bandas (FIGURA 5.14), obtenção da matriz de presença e ausência e análise de agrupamento.

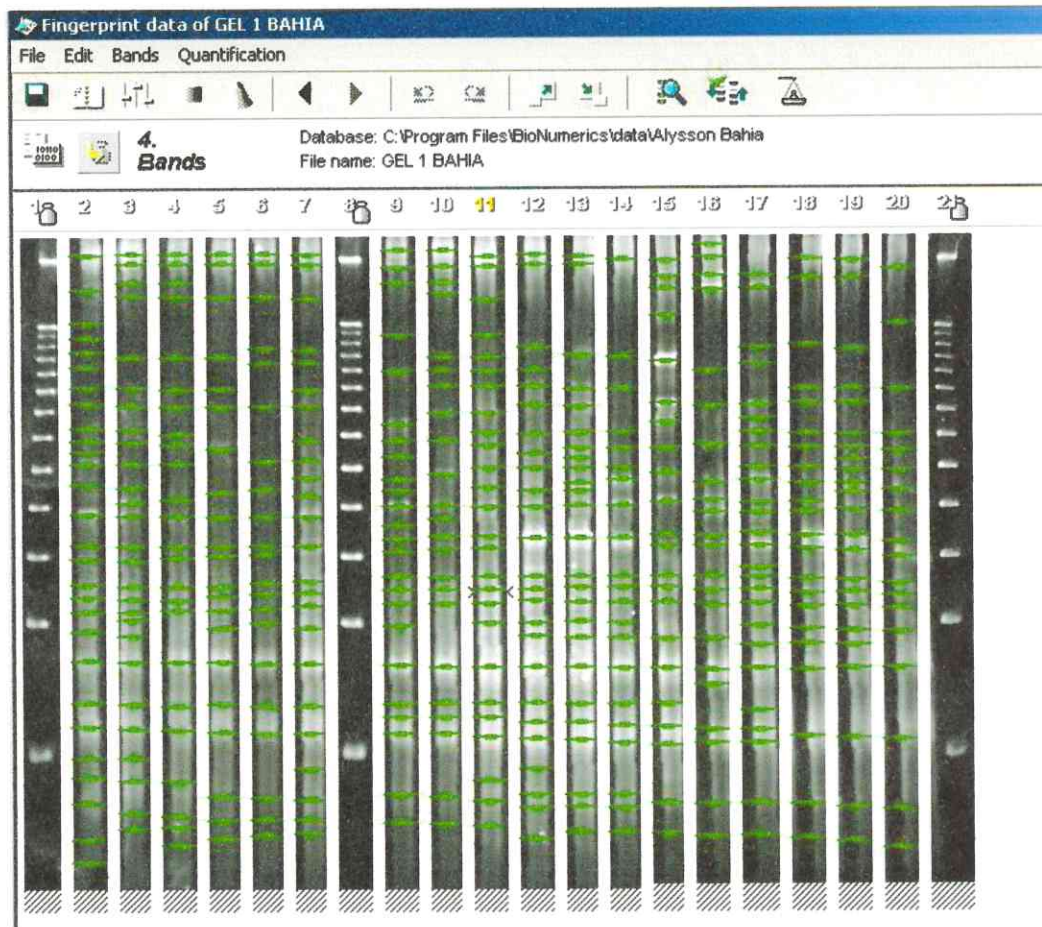


Figura 5.14- O Gel de DGGE durante análise no BioNumerics evidenciando as diferentes UTOs marcadas com bandas verdes.

Baseado no agrupamento utilizando-se a matriz binária de presença ou ausência de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) foi revelado uma separação em dois grandes agrupamentos (FIGURA 5.15). O padrão de mobilidade das bandas no decorrer do gradiente desnaturante reflete a dinâmica das comunidades bacterianas nos sedimentos ao longo da análise.

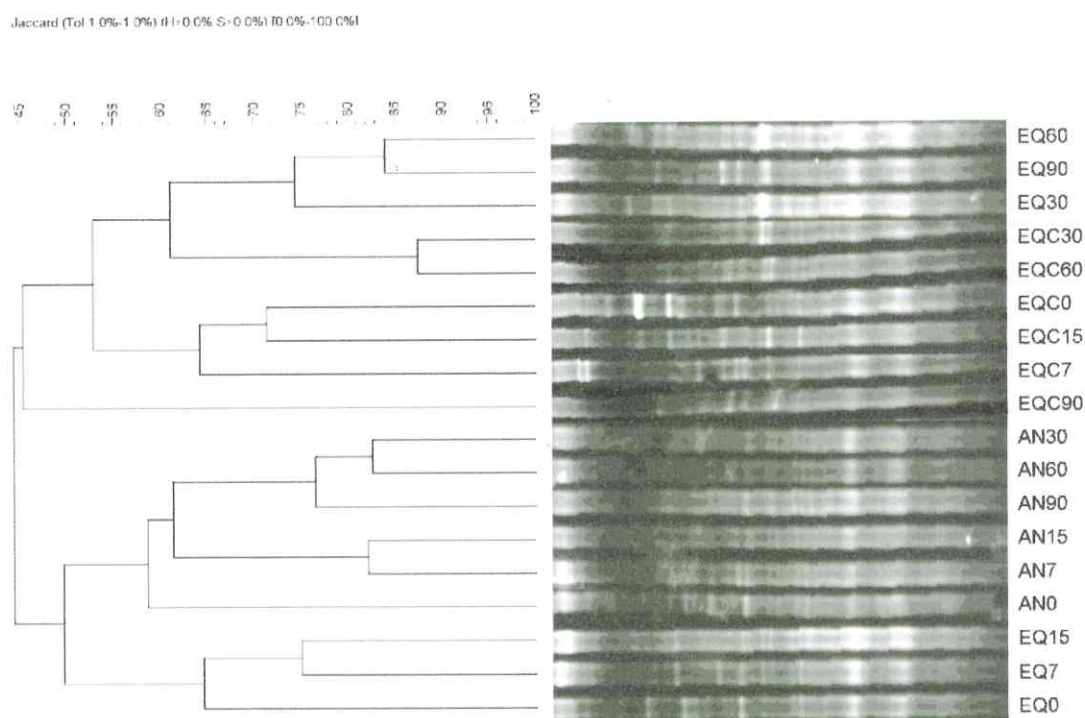


Figura 5.15- Análise de agrupamento dos perfis de UTOs obtidos por DGGE das condições experimentais avaliadas representadas por AN, EQ e EQC seguido pelo tempo de coleta nos microcosmos.

No agrupamento 1 as comunidades dos microcosmos de atenuação natural e as comunidades dos primeiros dias da condição utilizando bioestimulação com quitosana (EQ0, EQ7 e EQ15) agruparam juntas com 50% de similaridade.

No agrupamento 2 estão os tempos iniciais 0, 7 e 15 dias da condição de bioaumento (EQC) agrupados entre si e próximos com 53% de similaridade do grupo contendo o restante dos tempos das condições EQC e EQ. Já o tempo de 90 dias da condição EQC, apresentou-se como um grupo externo no agrupamento 2 com apenas 45% de similaridade com os demais.

No decorrer do experimento dentro das condições de biorremediação avaliadas por DGGE existem bandas que surgem com maior intensidade devido a estarem em maior número no ambiente naquele momento da dinâmica da comunidade. Essas UTOs mais proeminentes, provavelmente, estão relacionadas a linhagens bacterianas pioneiras, que são comuns no processo de sucessão ecológica em ambientes impactados e favorecem o crescimento de mais espécies no decorrer do tempo. Outra observação importante consiste na ocorrência de bandas durante todos os tempos nas diferentes condições testadas que, possivelmente, devem representar espécies bacterianas residentes nesses sedimentos e que conseguem sempre sobreviver independente das condições ambientais prevalentes.

5.4 DISCUSSÃO

Dando continuidade aos estudos na Rede Cooperativa em Recuperação de Áreas Contaminadas por Atividades Petrolíferas - RECUPETRO, com o objetivo de desenvolver e testar processos de descontaminação no manguezal da Baía de Todos-os-Santos. Essa segunda parte da tese se debruçou no desenvolvimento de um protocolo de imobilização em quitosana, na seleção de bactérias hidrocarbonoclásticas e produtoras de SACs compatíveis com o processo de imobilização, e em produzir esferas de quitosana com bactérias imobilizadas para estudos de biorremediação em microcosmos.

A quitosana, matriz polimérica escolhida como suporte de imobilização neste trabalho, é um polissacarídeo insolúvel em água, mas solúvel em ácidos orgânicos diluídos, onde assume aspecto gelatinoso devido à protonação dos grupos aminos, que gera o íon NH_3^+ em valores de pH menores que o da sua constante de dissociação (pKa), entre 6,2-7,0 (CHEN *et al.*, 2007). Logo, como no processo de imobilização de micro-organismos em matrizes de quitosana é necessário a adição da biomassa no gel, a resistência das células microbianas a valores baixos de pH, requeridos para solubilizar a quitosana, é essencial para o desenvolvimento do produto final. Uma característica importante da quitosana, que a torna um bom polímero para uso como suporte de imobilização, é o fato de que dependendo da maneira como o gel é coagulado pode-se obter biomateriais de diferentes formas como esferas e membranas, que podem ser usadas em diferentes aplicações.

Os processos de imobilização por aprisionamento de micro-organismos utilizando NaOH e tripolifosfato (TPP) apresentam algumas diferenças. A formação de esferas através da coagulação do gel de quitosana em solução de NaOH ocorre através da remoção dos íons H^+ dos grupo aminos NH_3^+ protonados através de uma reação instantânea com as hidroxilas livres na solução básica. Nesse procedimento de imobilização, as células microbianas são submetidas a um elevado valor de pH 12, que pode comprometer a viabilidade celular dos consórcios imobilizados como demonstrado neste trabalho.

Já no processo de imobilização utilizando solução de TPP, as células microbianas são menos afetadas pela condição alcalina, já que o pH da solução é 9,0. Nesse procedimento a coagulação é realizada através da formação de ligações cruzadas entre as cargas positivas dos grupamentos aminos das cadeias de quitosana e as cargas negativas da molécula de tripolifosfato. As peculiaridades dos diferentes processos de imobilização e os resultados de resistência dos consórcios bacterianos as diferentes metodologias resultaram na escolha do

processo de coagulação em TPP para o desenvolvimento do bioproduto. Nesse procedimento as condições são mais brandas e não comprometem a viabilidade do consórcio bacteriano.

Durante a formação de esferas por gotejamento em TPP as ligações cruzadas responsáveis pela coagulação do polímero também foram desenvolvidas através do contato superficial entre esferas de quitosana já formadas, o que acarretou na formação de um coágulo e comprometeu o processo de imobilização. Esse fenômeno foi observado na metodologia de coagulação utilizando a solução de TPP 2% (m/v), na qual as esferas flutuam e se ligam umas nas outras durante o gotejamento impedimento a formação de esferas individualizadas. Já a metodologia utilizando a solução de TPP na concentração 1% (m/v) foi mais apropriada para o processo de imobilização, pois as esferas ao serem formadas afundam e não entram em contato de superfície. As diferenças entre as duas metodologias em relação à flutuação das esferas deve-se a relação entre as diferentes densidades das soluções coagulantes e as esferas recém-formadas.

No processo de imobilização em quitosana é essencial a seleção de micro-organismos que sejam resistentes à atividade antimicrobiana desse biopolímero, as variações de pH do processo e que não produzam enzimas que degradem o polímero usado como matriz. Das 39 cepas avaliadas neste trabalho, 80% foram resistentes ao processo de imobilização e não produziram quitosanases. As cepas restantes foram susceptíveis a alguma das etapas do processo de imobilização e, conseqüentemente, foram descartadas como candidatas a imobilização nessa matriz.

A morte de micro-organismos promovida por moléculas de quitosana em solução é ocasionada principalmente pela presença de uma grande quantidade de cargas positivas provenientes dos grupamentos NH_3^+ que interagem com as cargas negativas da superfície celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Essas interações ocasionam alterações na permeabilidade da membrana celular comprometendo a estabilidade do envoltório celular e muitas vezes levando a lise (CHUNG; CHEN, 2008; LIU *et al.*, 2004). Outro mecanismo que ocasiona a morte de micro-organismos consiste no bloqueio da produção de RNA nos processos de transcrição devido à ligação da quitosana a moléculas de DNA no núcleo. Nesse processo o peso molecular da quitosana deve ser menor que 5000 Da para que seja possível a penetração de moléculas dentro das células (LIU *et al.*, 2001). Portanto, a atividade antimicrobiana da quitosana é dependente de suas características físicas, peso molecular e grau de desacetilação (BENHABILES *et al.*, 2012).

A produção de quitosanases por micro-organismos imobilizados em suportes de quitosana para aplicação ambiental somente é requerida em casos onde se deseja digerir a matriz imobilizante. Nessas situações, a liberação de micro-organismos ocorre em tempo relativamente programado de acordo com planejamento de atuação no sítio alvo desejado (JOBIN *et al.*, 2005). Essa tecnologia é aplicada na imobilização de esporos bacterianos, que podem digerir a matriz após germinação favorecendo sua liberação para fora das esferas (BARRETO *et al.*, 2010). É importante ressaltar que quitosanases são amplamente distribuídas na natureza, sendo produzidas por bactérias e fungos, garantindo a biodegradação da quitosana em condições naturais. Portanto, mesmo que não ocorra a produção de quitosanases por linhagens de micro-organismos imobilizados em esferas de quitosana, inevitavelmente a biomassa aprisionada será liberada após a degradação da matriz pela microbiota ambiental. As quitosanases são enzimas hidrolíticas que agem em condições ótimas de pH entre 4 e 8 e temperaturas entre 30 e 70 °C (SOMASHEKAR; JOSEPH, 1996) e essenciais na reciclagem da quitina na natureza e de grande importância biotecnológica (KUMAR, 2000).

Já em casos de aplicações em processos industriais, a rigidez e estabilidade de preparações imobilizadas são requisitos importantes. Nessas aplicações são necessários maiores tempos de prateleira ou operações biológicas de longo prazo, e a não degradação da matriz de imobilização é um fator positivo que amplia seu potencial de uso ambiental ou biotecnológico.

Análises por microscopia eletrônica de varredura mostraram detalhes da superfície e do interior das esferas de quitosana. As esferas são porosas e o tamanho e regularidade dos poros são compatíveis com o aprisionamento das células e a difusão de substratos, gases e metabólitos celulares, entre o meio externo e interno, de forma a não comprometer a funcionalidade do sistema. Hsieh *et al.* (2008) relataram a importância de se desenvolver um bom protocolo de imobilização para obtenção de produtos com boa funcionalidade. Foi demonstrado por esses pesquisadores que diferentes tratamentos de lavagem das esferas de quitosana após o processo de imobilização influenciavam na porosidade superficial e, conseqüentemente, no processo de degradação. Esferas de quitosana lavadas com solução de K_2HPO_4 e tampão fosfato salino (PBS) 0,15 M formam poros superficiais, sendo que no caso de esferas sem tratamento após a reticulação em TPP ou lavadas com água, não ocorrem à formação de poros. Esse fenômeno está relacionado a variações nas interações iônicas entre a quitosana e o TPP. As soluções de lavagem com maior força iônica, como os tampões, podem alterar ou prejudicar essas ligações de reticulação e influenciam o diâmetro e formação de

poros na superfície. Já nas esferas sem tratamento ou lavadas com água, as ligações permanecem intactas e resultam em uma superfície com microestrutura densa e sem poros.

A formação de poro tem efeito direto na eficiência do processo de degradação. Hsieh *et al.* (2008) demonstraram que células de *Pseudomonas putida* imobilizadas em esferas de quitosana lavadas com solução de K_2HPO_4 ou PBS foram capazes de degradar completamente 100 mg/L de fenol em até 12 h. Por outro lado, em esferas sem tratamento ou lavadas com água não ocorreu degradação mesmo após 72 h. Portanto, a lavagem com solução de K_2HPO_4 serve não apenas para remover o ácido acético e TPP residual, mas também para regular a formação de poros e determinar a eficiência do produto.

Esse mesmo efeito de interferência nas ligações cruzadas é observado em relação ao pH do meio onde as esferas são aplicadas. Em valores de pH mais elevados, os grupos aminas da quitosana tornam-se menos protonados resultando em uma menor força iônica na ligação cruzada formada entre a quitosana e TPP. Essa alteração induz uma maior formação de poros e influencia na eficiência do produto. Esferas contendo células de *P. putida* em valores de pH variando de 8 a 10 degradam 100% de uma concentração inicial de 100 mg/L de fenol em até 9 horas. Já em valores de pH 6,7 esse mesmo resultado foi alcançado com aproximadamente 40 horas (HSIEH *et al.*, 2008).

Em processos de biorremediação que utilizam bioaumentação é essencial o isolamento de micro-organismos com competência para serem funcionalmente ativos e persistirem sob as condições ambientais adversas no ambiente impactado. A biomassa microbiana utilizada como inóculo em processos de bioaumentação consiste em uma suspensão homogênea de células produzidas em biorreatores, sob condições ótimas, que ao serem aplicadas nos ambientes impactados sofrem estresses devido à complexidade do ambiente natural (TYAGI; FONSECA; CARVALHO, 2010). Essas limitações na transferência de culturas para áreas impactadas e sua posterior adaptação são pontos críticos dos processos de biorremediação utilizado bioaumentação. Os principais estresses bióticos e abióticos que limitam a manutenção da viabilidade celular, crescimento do inóculo microbiano e potencial de degradação, incluem flutuações ou extremos de temperatura, composição da água, valores de pH, oxigênio dissolvido, limitações nutricionais, toxicidade dos poluentes, competições intra e interespecíficas entre os micro-organismos introduzidos e os autóctones, e predação dos micro-organismos por protozoários existentes nas áreas impactadas (TYAGI; FONSECA; CARVALHO, 2010).

A utilização de micro-organismos imobilizados em um suporte polimérico, como a quitosana, constitui uma eficiente alternativa quando comparado ao uso de células microbianas livres. A tecnologia de imobilização oferece um microambiente mais estável para a sobrevivência da biomassa inoculada frente às condições ambientais adversas, além de diminuir as perdas de células microbianas por lixiviação. As vantagens deste microambiente promovido pelo processo de imobilização em esferas de quitosana podem ser evidenciadas nos experimentos de biorremediação em microcosmos realizados neste trabalho. Neste estudo ocorreu um aumento da biomassa bacteriana dentro das esferas até 15 dias de experimento, período em que ocorre a degradação deste biopolímero, e a análise por DGGE revelou um agrupamento diferenciado das UTOs nesse intervalo de tempo comparado aos outros tratamentos.

Apesar de vários trabalhos sempre descreverem a atividade antimicrobiana de quitosana em gel (BENHABILES *et al.*, 2012; CHUNG; CHEN, 2008; LIU *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2001) pudemos observar que as esferas de quitosana em decomposição estimularam a microbiota do sedimento. Esse efeito estimulante no crescimento também foi observado nos ensaios de biorremediação em microcosmos através do monitoramento de biomassa bacteriana e pelo agrupamento das UTOs geradas no gel de DGGE. Portanto, oligossacarídeos liberados durante a decomposição da quitosana tiveram efeito estimulante sobre populações de bactérias de sedimentos estuarinos.

É importante ressaltar que o estado policatiônico da quitosana, que exerce forte ação antimicrobiana, está presente apenas quando esse polímero encontra-se dissolvido em soluções ácidas e apresenta-se na forma de gel. Essas cargas positivas são neutralizadas no momento da coagulação para formação das esferas, anulando o efeito antimicrobiano desse biopolímero.

Em acidentes ambientais envolvendo derrames de petróleo, a toxicidade ocasiona um declínio das populações de micro-organismos nestes ambientes contaminados e a recuperação destes ecossistemas está relacionada a vários fatores ambientais que influenciam a taxa de degradação dos contaminantes pelos micro-organismos residentes ou adicionados por métodos de bioaugmentação. Os principais fatores limitantes são temperatura, nutrientes, valores de pH, quantidade de oxigênio, toxicidade, biodisponibilidade dos poluentes, salinidade, umidade e composição da comunidade de micro-organismos (TYAGI; FONSECA; CARVALHO, 2010).

Os sedimentos do manguezal da Baía de Todos-os-Santos utilizados nos ensaios de biorremediação em microcosmo estão contaminados por uma borra oleosa, extremamente recalcitrante, considerando que após mais de 10 anos do último registro de acidentes de derrame de petróleo, ainda se observa visivelmente a presença de óleo na camada mais superficial do sedimento. Foram avaliadas 3 estratégias de biorremediação neste trabalho: tratamentos de atenuação natural, utilização de esferas de quitosana e esferas de quitosana com consórcio bacteriano imobilizado.

Os resultados do estudo em microcosmos mostraram claramente que na atenuação natural (microcosmos sem tratamento) ocorreu uma redução significativa do número de bactérias totais nos primeiros 15 dias. Esse fenômeno pode ser atribuído a respostas adaptativas da comunidade microbiana a mudanças nas condições ambientais relacionadas com a montagem dos aquários. Por outro lado, os microcosmos que receberam esferas de quitosana e esferas de quitosana com bactérias imobilizadas, ao invés de diminuir o número de células bacterianas, apresentaram aumentos significativos da carga microbiana até 15 dias. Essas diferentes respostas das comunidades microbianas nesses tratamentos comparadas a atenuação natural, pode ser atribuída à entrada de uma nova fonte de carbono e nitrogênio provenientes da decomposição das esferas de quitosana. No microcosmo adicionado de esferas de quitosana com consórcio microbiano, o aumento no número de bactérias até 15 dias ocorreu de forma constante. Este aumento crescente da carga microbiana, provavelmente, ocorreu devido ao crescimento das células imobilizadas em um microambiente estável dentro das esferas, o que é importante por proteger e dar tempo para que a microbiota imobilizada se adapte as condições adversas do ambiente natural.

No período de 15 até 30 dias, no microcosmo de atenuação natural ocorreu uma recuperação da comunidade bacteriana a valores de contagem de células/g de sedimento próximos ao inicial, que com o passar do tempo, reduziu e estabilizou até 90 dias com valores inferiores a carga microbiana do início do experimento. Já nas condições adicionadas de esferas de quitosana e esferas de quitosana com bactérias imobilizadas, observou-se uma queda no elevado número de células bacterianas no período de 15-30 dias para valores próximos ao encontrado no início do experimento. No decorrer do tempo, no tratamento com esferas de quitosana a carga microbiana se estabilizou até 90 dias. Na condição com esferas de quitosana com bactérias imobilizadas também ocorreu uma estabilização do número de células bacterianas, só que apenas até 60 dias. Interessantemente, verificou-se um aumento significativo da carga microbiana até 90 dias, que pode estar relacionado a uma resposta das células bioaumentadas no sedimento frente aos contaminantes. É importante ressaltar que nas

duas estratégias de biorremediação propostas, o número de bactérias heterotróficas totais durante o tempo de experimento foi maior do que na atenuação natural. Esses resultados demonstram as influências positivas dos produtos aplicados na dinâmica das comunidades bacterianas nos diferentes microcosmos.

Os estudos das alterações na dinâmica da comunidade bacteriana por DGGE também revelaram respostas diferenciadas nos microcosmos tratados e não tratados. Foi verificada a formação de um agrupamento entre os tempos iniciais do tratamento com esferas de quitosana (EQ0, EQ7 e EQ15) e o grupo da atenuação natural. Interessantemente, a condição com esferas de quitosana agrupou-se diferente da atenuação natural somente após a decomposição das esferas com 15 dias. Esse resultado reforça a hipótese da ação prebiótica desse polímero na comunidade bacteriana do sedimento. Já as comunidades bacterianas nos microcosmos tratados com esferas de quitosana com bactérias imobilizadas se agrupam separadamente, diferenciando-se dos demais tratamentos desde o início do experimento até 15 dias. Esse agrupamento separado dos tempos iniciais pode possuir relação com o aumento das linhagens adicionadas ao sedimento imobilizadas dentro das esferas. Somente após o 15º dia de experimento, observou-se uma similaridade entre os tratamentos com esferas de quitosana e esferas de quitosana com bactérias imobilizadas. Esse período coincide com a decomposição das esferas e liberação da biomassa microbiana imobilizada para o sedimento. É importante destacar que após 90 dias de enriquecimento observou-se uma comunidade bacteriana diferenciada, apresentando-se como um grupo externo no agrupamento, corroborando com a tendência de crescimento confirmado pelo monitoramento da biomassa. Esses resultados podem estar relacionados à fixação do consórcio bacteriano no sedimento e revelam que o monitoramento deveria ter se prolongado por um maior período de tempo, para se atestar o verdadeiro efeito probiótico do bioaumento de bactérias *in situ*.

A avaliação do nível de contaminação dos hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP) por cromatografia gasosa nos diferentes tratamentos em microcosmos mostrou que não houve reduções estatisticamente significativas durante os 90 dias de experimento. Isso provavelmente se deve ao fato das frações mais recalcitrantes (HUANG et al., 2005) presentes 3A (C16-23) e 3B (C23-34) serem degradadas de forma lenta, preferencialmente através de vias anaeróbicas ou facultativas, pois a fina granulometria nos sedimentos de manguezais torna o oxigênio pouco disponível de forma a não atender a demanda microbiana para os processos aeróbicos (SANTOS *et al.*, 2011).

Outro fator que pode ser evocado para explicar porque não se verificou degradação após 90 dias de monitoramento é a baixa concentração dos contaminantes, cerca de 900 mg/Kg de sedimento ou 0,09% (m/m), o que torna difícil a detecção de variações significativas nos ensaios cromatográficos.

Em ambientes contaminados com moléculas recalcitrantes, como as encontradas nesse estudo, a biodisponibilidade dos contaminantes pode ser limitada por processos de transferência de massa e fatores tais como hidrofobicidade e solubilidade dos contaminantes. A aplicação de compostos ativos de superfície, como os biosurfactantes ou bioemulsificantes, é uma alternativa para aumentar o acesso aos hidrocarbonetos e melhorar a taxa de biodegradação. Portanto, sugerem-se futuros estudos com aplicações de compostos ativos de superfície produzidos pelas linhagens isoladas desse sedimento para avaliar o efeito na biodisponibilidade de poluentes e atividade biodegradativa. É importante ressaltar que antes de qualquer aplicação de SACs no meio ambiente são necessários estudos toxicológicos prévios para confirmação da inofensividade do emprego dessas biomoléculas. Também podem ser testadas mais de uma aplicação do produto desenvolvido no decorrer do tempo para reforçar a atividade biodegradativa.

É importante ressaltar que mesmo não tendo sido detectado uma redução estatisticamente significativa nos HTPs, é fato que a estimulação com esferas de quitosana (uma fonte de carbono e nitrogênio) ou a bioaumentação com 17 linhagens de um consórcio de bactérias autóctones imobilizadas em quitosana promoveram alterações na dinâmica da comunidade e revelam que não existem limitações populacionais para biodegradação, sendo possível manipular a diversidade microbiana do local visando direcioná-la para a biodegradação de poluentes.

O uso da quitosana como matriz para aprisionamento de células neste trabalho além de facilitar a introdução de células no ambiente também serviu como fonte de carbono e auxiliou na manutenção numérica das populações, trazendo benefícios para comunidade microbiana autóctone. Além deste ponto positivo, as esferas de quitosana reticuladas com TPP ao serem degradadas fornecem uma fonte adicional de nitrogênio e fósforo, que pode favorecer os processos degradativos dos hidrocarbonetos do petróleo. É importante mencionar que também podem ser adicionados nutrientes essenciais às esferas de quitosana durante o processo de imobilização aumentando ainda mais o valor nutricional. Atualmente, os procedimentos de biorremediação utilizando bioaumento e bioestímulo estão emergindo como complementares em processos de recuperação de áreas impactadas devido à complexidade e

limitações dessas técnicas quando aplicadas individualmente (TYAGI; FONSECA; CARVALHO, 2010).

Nas últimas décadas as técnicas de bioaumentação têm atraído o interesse comercial e várias formulações de produtos estão sendo desenvolvidas e aplicadas visando à rápida descontaminação de áreas impactadas. O desenvolvimento de equipamentos que viabilizem a produção destes novos produtos para aplicações em biorremediação é essencial no processo de escalonamento após estudos realizados em laboratórios. Os equipamentos desenvolvidos neste trabalho para a produção de biomateriais em larga escala são tecnologias novas, genuinamente brasileiras e de fundamental importância em futuros processos produtivos.

A manutenção das características de produtos até aplicação também é de extrema importância. A conservação das características funcionais até 120 dias, sob refrigeração, do bioproduto desenvolvido neste trabalho é importante para garantir uma quantidade relevante de micro-organismos viáveis imobilizados durante futuros procedimentos de produção, embalagem, estocagem, transporte e aplicação em processos de biorremediação. No entanto, qualquer produto antes de utilizado necessita ser avaliado em relação aos requerimentos ambientais prevalentes na área contaminada. A atividade metabólica, adaptabilidade e competência ecológica dos inoculantes comerciais são as maiores limitações para o sucesso durante os processos de biorremediação (TYAGI; FONSECA; CARVALHO, 2010). Tendo em vista essas limitações, é difícil um produto comercial ser tão robusto para ser eficiente quando exposto a diferentes ecossistemas. Portanto, muitas vezes é de fundamental importância o desenvolvimento de novos produtos baseados em culturas enriquecidas de micro-organismos autóctones competentes para aplicações específicas por apresentarem uma resposta mais apropriada, eficiente e economicamente viável nas condições locais de áreas impactadas.

5.5 CONCLUSÕES

Consórcios bacterianos selecionados neste estudo foram aprisionados com sucesso em esferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato gerando um bioproduto com características mecânicas e funcionais promissoras para utilização na biorremediação *in situ* ou *ex situ* de sedimentos contaminados com hidrocarbonetos do petróleo.

As esferas propiciaram um ambiente favorável ao crescimento das bactérias aprisionadas, garantindo trocas gasosas e entrada de nutrientes através de seus poros. Dentro de 15 dias de contato com os sedimentos as esferas foram degradadas pela microbiota nativa, liberando a biomassa aprisionada para o ambiente.

A matriz de quitosana, além de fornecer vantagens aos consórcios imobilizados, demonstrou atividade prebiótica e favoreceu o crescimento das comunidades microbianas autóctones. Esse bioproduto possui propriedades que contemplam os processos de bioaumento e bioestímulo, o que é importante visto a complexidade e limitações relacionadas aos processos de biorremediação em ambientes contaminados.

Apesar da bioaugmentação confirmada nos microcosmos, não foram detectadas reduções significativas dos poluentes medidos após 90 dias de experimento, revelando que apenas o aumento do número de células não foi suficiente para reduzir os contaminantes recalcitrantes no sedimento da BTS nas condições experimentais adotadas, possivelmente, devido à baixa concentração e a natureza recalcitrante dos hidrocarbonetos e a fatores limitantes como a biodisponibilidade dos poluentes e/ou a quantidade de oxigênio.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista os resultados obtidos nos experimentos de microcosmos, novos estudos são necessários para aperfeiçoar o processo de degradação de hidrocarbonetos. Sugerimos que sejam realizados estudos com maiores níveis de contaminação e com tempo mais prolongado para se verificar o real efeito probiótico dos consórcios bioaumentados, ensaios de aplicação de biossurfactantes ou bioemulsificantes produzidos pelas linhagens desse trabalho para avaliarmos os efeitos na biodisponibilidade dos hidrocarbonetos, testes com mais de uma aplicação do produto para reforçar a atividade biodegradativa, e estudos de adição de nutrientes às esferas de quitosana durante o processo de imobilização para regular os valores nutricionais ideais para os processos degradativos. É importante ressaltar que através dos processos e tecnologias desenvolvidas neste estudo foram gerados 4 diferentes consórcios imobilizados prontos para serem aplicados e que apenas o produto contendo o consórcio PET foi avaliado, logo, ensaios de aplicação dos outros consórcios (HPA, QUE e HEX) também seriam revelantes. Também é importante dar continuidade aos estudos de desenvolvimento dos equipamentos para viabilizar o escalonamento e a produção dos produtos visando aplicações em processos de biorremediação. Bem como, o processo de customização do produto para torná-lo cada vez mais adaptado as condições ambientais antes da aplicação e para atender todas as exigências legais para o uso de remediadores no Brasil requeridas pelo CONAMA em sua resolução nº 314, de 29 de outubro de 2002, e pelo IBAMA em sua Instrução Normativa IBAMA nº 5, de 19 de maio de 2010.

7 REFERÊNCIAS

ABDEL AZIM, A. A. A.; ABDUL-RAHEIM, A. R. M.; KAMEL, R. K.; ABDEL-RAOUF, M. E. Demulsifier systems applied to breakdown petroleum sludge. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v.78, n.2, p.364-370, 2011.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**, 2nd, Ed. New York:Academic Press, 1999, p.453.

ALONGI, D. M. Early growth responses of mangroves to different rates of nitrogen and phosphorus supply. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.397, p.85-93, 2011.

ALONGI, D. M. Present state and future of the world's mangrove forests. **Australian Institute Marine Science**, v.29, p.331-349, 2002.

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410, 1990.

AL-TURKI, A. I. Microbial polycyclic aromatic hydrocarbons degradation in soil. **Research Journal of Environmental Toxicology**, v.3, p.1-8, 2009.

ALVAREZ, P. J. J; ILLMAN, W. A. **Bioremediation and Natural Attenuation: Process Fundamentals and Mathematical Models**. New Jersey: Copyright © John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2006, p.612.

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

BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Sussex, v.80, n.7, p.723-736, 2005.

BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.87, p.427-444, 2010.

BANCROFT, W. D. The theory of emulsification. **Journal of Physical Chemistry**, v.17, p.501-519, 1913.

BAPTISTA NETO, J. A.; SMITH, B. J.; McALLISTER, J. J. Heavy metal concentrations in surface sediments in a nearshore environment, Jurujuba Sound, Southeast Brazil. **Environmental Pollution**, v.109, p.1-9, 2000.

BARRETO, R. V. G.; HISSA, D. C.; PAES, F. A.; GRANGEIRO, T. B.; NASCIMENTO, R. F.; REBELO, L. M.; CRAVEIRO, A. A.; MELO, V. M. M. New approach for petroleum hydrocarbon degradation using bacterial spores entrapped in chitosan beads. **Bioresource technology**, v.101, p.2121-2125, 2010.

BELLOCQ, A. M.; BIAIS, J., BOTHOREL, P.; CLIN, B.; FOURCHE, G.; LALANNE, P.; LEMAIRE, B.; LEMANCEAU, B.; ROUX, D. Microemulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.20, p.167-272, 1984.

BENHABILES, M. S.; SALAH, R.; LOUNICI, H.; DROUICHE, N.; GOOSEN, M. F. A.; MAMERI, N. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. **Food Hydrocolloids**, v.29, p.48-56, 2012.

BERNINI, E.; SILVA, M. A. B.; CARMO, T. M. S.; CUZZUOL, G. R. F. 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.

BICKERSTAFF, G. F. **Immobilization of Enzymes and Cells. In: Immobilization of Enzymes and Cells: Methods in Biotechnology**. Bickerstaff, G. F. (ed.). Totowa, New Jersey: Humana Press, Inc., 1997, p.1-11.

BONILLA, M.; OLIVARO, C.; CORONA, M.; VAZQUEZ, A.; SOUBES, M. Production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.456-463, 2005.

BRITO, E. M.; DURAN, R.; GUYONEAUD, R.; GONI-URRIZA, M.; GARCIA DE OTEYZA, T.; CRAPEZ, M. A.; ALELUIA, I.; WASSERMAN, J. C. A. A case study of in situ oil contamination in a mangrove swamp (Rio de Janeiro, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v.58, p.418-423, 2009.

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

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

CALVO, C.; SILVA-CASTRO, G. A.; UAD, I.; FANDIÑO, C. G.; LAGUNA, J.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Efficiency of the EPS emulsifier produced by *Ochrobactrum anthropi* in different hydrocarbon bioremediation assays. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35 p.1493-1501, 2008.

CAMEOTRA, S. S.; SINGH, P. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. **Microbial Cell Factories**, v.8, p.16, 2009.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. Biocatalizadores imobilizados: uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.36, p.48-57, 2006.

CARREIRA, R.; WAGENER, A. L. R.; FILEMAN, T.; READMAN, J. Distribuição de coprostanol (5 β (H)-COLESTAN- 3 β -OL) em sedimentos superficiais da Baía de Guanabara: indicador da poluição recente por esgotos domésticos. **Química Nova**, v.24, p.37-42, 2001.

CELINO, J. J., QUEIROZ, A. F. S. Fonte e grau de contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de baixa massa molecular em sedimentos da baía de Todos os Santos, Bahia. **Geociências**, v.59, p.265-270, 2006.

CELINO, J. J.; TRIGUIS, J.A.; VEIGA, I.G.; QUEIROZ, A.F.S. Biomarcadores e "fingerprints" de hidrocarbonetos nos sedimentos de manguezais na porção norte da baía de Todos os Santos, Bahia. **Revista Brasileira de Geociências**, v.38, n.2, p.186-196, 2008.

CERQUEIRA, V. S.; HOLLENBACH, E. B.; MABONI, F.; CAMARGO, F. A. O.; PERALBA, M. C. R.; BENTO, F. M. Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, p.1203-1222, 2012.

CERQUEIRA, V. S.; HOLLENBACH, E. B.; MABONI, F.; VAINSTEIN, M. H.; CAMARGO, F. A. O.; PERALBA, M. C. R.; BENTO, F. M. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. **Bioresource Technology**, v.102, p.11003-11010, 2011.

CHAMANROKH, P.; MAZAHARI ASSADI, M.; NOOHI, A.; YAHYAI, S. Emulsan Analysis produced by locally isolated bacteria and *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. **Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering**, v.5, n.2, p.101-108, 2008.

CHEN, Y. M.; LIN, T. F.; HUANG, C.; LIN, J. C.; HSIEH, F. M. Degradation of phenol and TCE using suspended and chitosan-beads immobilized *Pseudomonas putid*. **Journal of Hazardous Materials**, v.148, p.660-670, 2007.

CHENG, C. Y.; LI, Y. K. An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.2, p.197-203, 2000.

CHUNG, Y. C.; CHEN, C. Y. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. **Bioresource Technology**, v.99, p.2806-2814, 2008.

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E.; CONTIERO, J. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2- 1 from cassava wastewater. **Process Biochemistry**, v.45, p.1511-1516, 2010.

CRÁPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G. S.; PREREIRA, D. C. Tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, v.30, n.179, p.32-37, 2002.

CRAVEIRO, A. A., CRAVEIRO, A. C.; QUEIROZ, D. C. **Quitosana a Fibra do Futuro**, 2nd Ed. Ceará:PADETEC, 2004, p.218.

DA SILVA, F. S.; LAUT, V. M.; LAUT L. L. M., FIGUEIREDO Jr, A. G.; BONETTI, C.; VIANA, L. G.; CRAPEZ, M. A. C. **Avaliação da qualidade ambiental em sedimentos superficiais do estuário de Itacorubi - Baía Norte (SC), utilizando a relação granulometria e atividade respiratória bacteriana**. Guarapari-ES, Brasil: Proceedings X Congresso da ABEQUA, CD-ROM, 2005.

DANIEL, R. The soil metagenome- a rich resource for the discovery of novel natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, p.199-204, 2004.

DANIELS, R.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.28, p.261-289, 2004.

DARVISHI, P.; AYATOLLAHI, S.; MOWLA, D.; NIAZI, A. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPP1-2. **Colloids and Surfaces: Biointerfaces**, v.84, p.292-300, 2011.

DAS, S.; LYLA, P. S.; KHAN, S. A. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. **Current Science**, v.90, p.1325-1335, 2006.

DIAS, A. C. F., ANDREOTE, F. D., ANDREOTE, F. D., LACAVA, P. T., SÁ, A. L. B., MELO, I. S., AZEVEDO, J. L., ARAÚJO, W. L. Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v.25, p.1305-1311, 2009.

DIAS, A. C. F.; ANDREOTE, F. D.; RIGONATO, J.; FIORE, M. F.; MELO, I. S.; ARAÚJO, W. L. The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.98, p.541-551, 2010.

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

DUKE, N. C.; BURNS, K. A.; SWANNELL, R. P. J.; DALHAUS, O.; RUPP, R. J. Dispersant use and a bioremediation strategy as alternate means of reducing impacts of large oil spills on mangroves: the gladstone field trials. **Marine Pollution Bulletin**, v.41, p.403-412, 2000.

EL FANTROUSSI, S.; AGATHOS, S.N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p.268-275, 2005.

EWING, B., GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v.8, p.186-194, 1998.

EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M., GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, p.175-185, 1998.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, p.783-791, 1985.

FERHAT, S.; MNIF, S.; BADIS, A.; EDDOUAOUDA, K.; ALOUAOUI, R.; BOUCHERIT, A.; MHIRI, N.; MOULAI-MOSTEFA, N.; SAYADI, S. Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.65, p.1182-1188, 2011.

FOGHT, J. Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospects. **Journal of Molecular and Microbiology and Biotechnology**, v. 15, p 93-120, 2008.

FOOD & AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **The World's mangroves**, 1980-2005. Rome, Italy: FAO Forestry Paper No. 153, 2007, p.78.

FRANZETTI, A.; BESTETTI, G.; CAREDDA, P.; COLLA, P. L.; TAMBURINI, E. Surface-active compounds and their role in the access to hydrocarbons in *Gordonia* strains. **FEMS Microbiology Ecology**, v.63, p.238-248, 2008.

- FRANZETTI, A.; CAREDDA, P.; RUGGERI, C.; COLLA, P. L.; TAMBURINI, E.; PAPACCHINI, M.; BESTETTI, G. Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil remediation technologies. **Chemosphere**, v.75, p.801-807, 2009.
- FUSCONI, R.; ASSUNÇÃO, R. M. N.; GUIMARÃES, R. M.; FILHO, G. R.; MACHADO, A. E. H. Exopolysaccharide produced by *Gordonia* polyisoprenivorans CCT 7137 in GYM commercial medium and sugarcane molasses alternative medium: FT-IR study and emulsifying activity. **Carbohydrate Polymers**, v.79, p.403-408, 2010.
- GARRITY, G. M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G. **Taxonomic Outline of The Prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2.ed. Release 5.0. New York:Springer, 2004.
- GENTILI, A. R.; CUBITTO, M. A.; FERRERO, M.; RODRIGUÉZ, M. S. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbondegrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.57, p.222-228, 2006.
- GHAMGUA, H.; MILED, N.; REBAI, A.; KARRA-CHAÂBOUNI, M.; GARGOURI, YOUSSEF. Production of mono-olein by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system: Optimization by response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.717-723, 2006.
- GIRI, C.; OCHIENG, E., TIESZEN, L. L., ZHU, Z., SINGH, A., LOVELAND, T., MASEK, J., DUKE, N. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. **Global Ecology and Biogeography**, v.20, p.154-159, 2011.
- GORDON, D., ABAJIAN, C., GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v.8, p.195-202, 1998.
- GRIFFIN, W. C. Classification of surface active agents by HLB. **Society of Cosmetic Chemists**, v.1, p.311-326, 1949.
- GUO, C. L.; ZHOU, H.W.; WONG, Y.S.; TAM, N. F. Y. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. **Marine Pollution Bulletin**, v.51, p.1054-1061, 2005.
- HAMDI, H.; BENZARTI, S.; MANUSADZIANAS, L.; AOYAMA, I.; JEDIDI, N. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v.39, p.1926-1935, 2007.
- HAMMOND. The current magnitude of biodiversity. **Global Biodiversity Assessment**, v.32, p.278-285, 1998.
- HERZ, R. **Manguezais do Brasil**. Instituto Oceanográfico. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1991, 227 p.
- HILYARD, E. J.; JONES-MEEHAN, J. M.; SPARGO, B. J.; HILL, R. T. Enrichment, isolation, and phylogenetic identification of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Elizabeth River sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.1176-1182, 2008.

- HOLGUIN, G. V. P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: An overview. **Biology and Fertility of Soils**, v.33, p.265-278, 2001.
- HSIEH, F. M.; HUANG, C.; LIN, T. F.; CHEN, Y. M.; LIN, J. C. Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation. **Process Biochemistry**, v.43, p.83-92, 2008.
- HUANG X. F.; GUAN, W.; LIU, J.; LU, L. J.; XU, J. C.; ZHOU, Q. Characterization and phylogenetic analysis of biodemulsifier-producing bacteria. **Bioresource Technology**, v.101, p.317-323, 2010.
- HUANG, X. D., EL-ALAWI, Y., GURSKA, J., GLICK, B. R., GREENBERG, B. M. A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. **Microchemical Journal**, v.81, p.139-147, 2005.
- HUIJIE, L.; CAIYUN, Y.; YUN, T.; GUANGHUI, L.; TIANLING, Z. Using population dynamics analysis by DGGE to design the bacterial consortium isolated from mangrove sediments for biodegradation of PAHs. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.65, p.269-275, 2011.
- IQBAL, S.; KHALID, Z. M.; MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyper production of biosurfactant by gamma ray induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, p.176-179, 1995.
- ITO, H.; HOSOKAWA, R.; MORIKAWA, M.; OKUYAMA, H. A turbine oil-degrading bacterial consortium from soils of oil fields and its characteristics. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.61, p.223-232, 2008.
- IVANOV, I. B.; KRALCHEVSKY, P. A. Stability of emulsions under equilibrium and dynamic conditions. **Colloids and Surfaces a Physicochemical and Engineering Aspects**, v.128, p.155-175, 1997.
- JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.4, 2007.
- JOBIN, G.; COUTURE, G.; GOYER, C.; BRZEZINSKI, R.; BEAULIEU, C. Streptomycete spores entrapped in chitosan beads as a novel biocontrol tool against common scab of potato. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.68, p.104-110, 2005.
- KATHIRESAN, K.; QASIM, S. Z. **Biodiversity of Mangrove Ecosystems**. New Delhi: Hindustan Publishing Corporation, 2005, p.1-251.
- KE, L., WANG, W. Q., WONG, T. W. Y., WONG, Y. S., TAM, N. F. Y. Removal of pyrene from contaminated sediments by mangrove microcosms. **Chemosphere**, v.51, p.25-34, 2003.
- KIM, Y. H.; WASAN, D. T. Effect of demulsifier partitioning on the destabilization of water-in-oil emulsions. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v.35, p.1141-1149, 1996.

KOKAL, S. **Crude Oil Emulsion: A State of Art Review**. Santo Antonio, Texas, USA: SPE Annual Technical Conference and exhibition, 77497, 29 September - 2 October, 2002.

KRISTENSEN, E. B. S.; DITTMAR, T.; MARCHAND, C. Organic carbon dynamics in mangrove ecosystems: A review. **Aquatic Botany**, v.89, p.201-219, 2008.

KRISTENSEN, E.; ALONGI, D. M. Control by fiddler crabs (*Uca vocans*) and plant roots (*Avicennia marina*) on carbon, iron and sulfur biogeochemistry in mangrove sediment. **Limnology and Oceanography**, v.51, p.1557-1571, 2006.

KRISTENSEN, E.; KING, G. M.; HOLMER, M.; BANTA, G. T.; JENSEN, M. H.; HANSEN, K.; BUSSARAWIT, N. Sulfate reduction, acetate turnover and carbon metabolism in sediments of the Ao-Nam-Bor mangrove, Phuket, Thailand. **Marine Ecology Progress Series**, v.109, p.245-255, 1994.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v.46, p.1-27, 2000.

KURITA, K. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. **Marine Biotechnology**, v.8, p.203-226, 2006.

LAFORTUNE, I.; JUTEAU, P.; DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; BEAUDET, R.; VILLEMUR, R. Bacterial diversity of a consortium degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons. **Microbial Ecology**, v.57, p.455-468, 2009.

LANE, D. J. **16S/23S rRNA Sequencing**. In: Stackebrandt E., Goodfellow M., eds. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: John Wiley & Sons, 1991, p.115-175.

LAW, R. J. Hydrocarbon concentrations in water and sediments from UK marine waters determined by fluorescence spectroscopy. **Marine Pollution Bulletin**, v.12, p.153-157, 1981.

LEE, S. Y.; DUNN, R. J. K.; YOUNG, R. A.; CONNOLLY, R. M.; DALE, P. E. R.; DEHAYR, R. Impact of urbanization on coastal wetland structure and function. **Austral Ecology**, v.31, p.149-163, 2006.

LIN, T. C.; YOUNG, C. C.; HO, M. J.; YEH, M. S.; CHOU, C. L.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Characterization of floating activity of indigenous diesel-assimilating bacterial isolates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.99, n.5, p.466-472, 2005.

LIU, H.; DU, Y.; WANG, X.; SUN, L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. **International Journal of Food Microbiology**, v.95, p.147-155, 2004.

LIU, J.; HUANG, X. F.; LU, L. J.; XU, J. C.; WEN, Y.; YANG, D. H.; ZHOU, Q. Comparison between waste frying oil and paraffin as carbon source in the production of biodemulsifier by *Dietzia* sp. S-JS-1. **Bioresource Technology**, v.100, p.6481-6487, 2009.

LIU, X. F.; GUAN, Y. L.; YANG, D. Z.; LI, Z.; DE YAO, K. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. **Journal of Applied Polymers Science**, v.79, n.7, p.1324-1335, 2001.

LUO, Y. R.; TIAN, Y.; HUANG, X.; YAN, C. L.; HONG, H. S.; LIN, G. H.; ZHENG, T.L. Analysis of community structure of a microbial consortium capable of degrading benzo(a)pyrene by DGGE. **Marine Pollution Bulletin**, v.58, p.1159-1163, 2009.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **Applied and Industrial Microbiology and Biology**, p.1-5, 2011.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? **Biotechnology Letters**, 2012.

MARCHESI, J.R.; SATO, T.; WEIGHTMAN, A. J.; MARTIN, T. A.; FRY, J. C.; HIAM, S. J.; DYMNOCK, D.; WADE, W. G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.795-799, 1998.

MASCARELLI, A. Deepwater Horizon: After the oil. **Nature**, v.467, p.22-24, 2010.

MAZAHERI ASSADI, M.; TABATABAEE, M. S. Biosurfactants and their use in upgrading petroleum vacuum distillation residue: a review. **International Journal of Environmental Research**, v.4, n.4, p.549-572, 2010.

MCCARTHY, A. J.; WILLIAMS, S. T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment - a review. **Gene**, v.115, p.189-192, 1992.

MCINERNEY, M. J.; DUNCAN, K. E.; YOUSSEF, N.; FINCHER, T.; MAUDGALYA, S. K.; FOLMSBEE, M. J.; KNAPP, R.; SIMPSON, R. R.; RAVI, N.; NAGLE, D. **Final report to the U. S. Department of Energy: development of microorganisms with improved transport and biosurfactant activity for enhanced oil recovery**. DE-FC-02NT15321 R 02. Norman: University of Oklahoma, OK, 2005.

MECKENSTOCK, R.U.; SAFINOWSKI, M.; GRIEBLER, C. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 12, p. 257-276, 2004.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v.34, n.5, p.831-840, 2011.

MNIF, S.; CHAMKHA, M.; LABAT, M.; SAYADI, S. Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v.111, p.525-536, 2011.

MROZIK, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. **Microbiological Research**, v.165, p.363-375, 2010.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v.133, p.183-198, 2005.

MUYZER, G.; DE WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.695-700, 1993.

NADARAJAH, N.; SINGH, A.; WARD, O. P. De-emulsification of petroleum oil emulsion by a mixed bacterial culture. **Process Biochemistry**, v.37, p.1135-1141, 2002.

NAKATSU, C. H. Soil Microbial Community Analysis Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Soil Science Society of America Journal**, v.71, p.562-571, 2007.

NIKOLOPOULOU, M.; KALOGERAKIS, N. Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.84, p.802-807, 2009.

NITSCHKE, M.; PASTORE, M. G. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, v.25, n.5, p.772-776, 2002.

NUBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence Heterogeneities of Genes Encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v.178, p.5636-5643, 1996.

PAIXÃO, D. A. A.; DIMITROV, M. R.; PEREIRA, R. M.; ACCORSINI, F. R.; VIDOTTI, M. B.; LEMOS, E. G. M. Molecular analysis of the bacterial diversity in a specialized consortium for diesel oil degradation. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, p.773-781, 2010.

PANDEY, J.; CHAUHAN, A.; JAIN, R. K. Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of in situ bioremediation. **FEMS Microbiology Reviews**, v.33, p.324-375, 2009.

PEIXOTO, R.; CHAER, G. M.; CARMO, F. L.; ARAÚJO, F. V.; PAES, J. E.; VOLPON, A.; SANTIAGO, G. A.; ROSADO, A. S. Bacterial communities reflect the spatial variation in pollutant levels in Brazilian mangrove sediment. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.99, p.341-354, 2011.

PIZA, F. F.; PRADO, P. I.; MANFIO, G. P. Investigation of bacterial diversity in Brazilian tropical estuarine sediments reveals high actinobacterial diversity. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.86, p.317-328, 2004.

QUEIROZ, A. F. S.; CELINO, J. J. Environmental damage from petroleum industry in mangrove areas in the northern region of baía de Todos os Santos (Bahia, Brazil). **Boletim Paranaense de Geociências**, n.62-63, p.23-34, 2008.

RAVID, D. O.; RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Horizontal transfer of an exopolymer complex from one bacterial species to another. **Environmental Microbiology**, v.2, n.4, p.366-372, 2000.

RICHARD, J. Y.; VOGEL, T. M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.44, p.93-100, 1999.

ROMEIRO, R.S. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em suspensão.** Laboratório de bacteriologia de plantas. Viçosa: UFV. Disponível em:<<http://www.ufv.br/dfp/bac/uni9.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2008.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.249-252, 2002.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Minireview: Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v.3, n.4, p.229-236, 2001.

ROODBARI, N. H.; BADIEI, A.; SOLEIMANI, E.; KHANIANI, Y. Tweens demulsification effects on heavy crude oil/water emulsion. **Arabian Journal of Chemistry**, 2011.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High and low molecular mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.52, p.154-162, 1999.

SANTOS H. F., CURY J. C., CARMO F. L., SANTOS A. L., TIEDJE, J., ELSAS, J. D. V.; ROSADO, A. S.; PEIXOTO, R. S. Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. **PLOS ONE**, v.6, n.3, e16943, 2011b.

SANTOS, H. F., CARMO, F. L., PAES, J. E. S., ROSADO, A. S., PEIXOTO, R. S. Bioremediation of Mangroves Impacted by Petroleum. **Water, Air & Soil Pollution**, v.216, p.329-350, 2011a.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v.30, p.489-511, 2012.

SATOKARI, R. M.; VAUGHAN, E. E.; AKKERMANS, A. D. L.; SAARELA, M.; DE VOS, W. M. Bifidobacterial Diversity in Human Feces Detected by Genus- Specific PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.504-513, 2001.

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., eds. Soil organic matter:analysis and interpretation. Madison, SSSA-ASA, 1996, p.21-31.

SEO, J. S.; KEUM, Y. S.; LI, Q. X. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.6, p.278-309, 2009.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v.27, p.30-39, 2009.

SILVA, T. F.; AZEVEDO, D. A.; NETO, F. R. A. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments and waters from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.18, p.628-637, 2007.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology:Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v.25, p.99-121, 2007.

SOMASHEKAR, D.; JOSEPH, R. Chitosanases- properties and applications:a review. **Bioresource and Technology**, v.55, p.35-45, 1995.

SPALDING, M.; KAINUMA, M.; COLLINS, L. **World Atlas of Mangroves**. Spalding, M.; Kainuma, M.; Collins, L (ed.) London, Washington D.C:Earthscan, 2010, 319 p.

STENUIT, B.; EYERS, L.; SCHULER, L.; AGATHOS, S. N.; GEORGE, I. Emerging high-throughput approaches to analyze bioremediation of sites contaminated with hazardous and/or recalcitrant wastes. **Biotechnology Advances**, v.26, p.561-575, 2008.

SUGUIO, K. **Introdução à Sedimentologia**. 1ª ed. São Paulo:Edgard Blücher/EDUSP, 1973, p.317.

TABATABAEE, A.; MAZAHARI ASSADI, M.; NOOHI, A. A.; SAJADIAN, V. A. Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs. **Iranian Journal of Environmental Health, Science and Engineering**, v.2, n.1, p.6-12, 2005.

TADROS, T. F. **Emulsion Science and Technology: A General Introduction**. Edited by Tharwat F. Tadros Copyright © 2009 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim ISBN: 978-3-527-32525-2

TADROS, T; IZQUIERDO, P., ESQUENA, J., SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.108-109, p.303-318, 2004.

TAKETANI, R. G.; FRANCO, N. O.; ROSADO, A. S.; ELSAS, J. D. V. Microbial community response to a simulated hydrocarbon spill in mangrove sediments. **The Journal of Microbiology**, v.48, n.1, p.7-15, 2010.

TAM, N. F. Y., KE, L., WANG, X. H.; WONG, Y. S. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of mangrove swamps. **Environmental Pollution**, v.114, p.225-263, 2001.

TAM, N. F. Y.; GUO, C. L.; YAU, W. Y.; WONG, Y. S. Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong Kong. **Marine Pollution Bulletin**, v.45, p.316-324, 2002.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M., KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1596-1599, 2007.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TIAN, Y.; LIU, H. J.; ZHENG, T. L.; KWON, K. K., KIM, S. J., YAN, C. L. PAHs contamination and bacterial communities in mangrove surface sediments of the Jiulong River Estuary, China. **Marine Pollution Bulletin**, v.57, p.707-715, 2008.

TOMLINSON, P. B. **The Botany of mangroves**. Cambridge:Cambridge University Press, 1986, p.418.

- TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, v.14, n.4, p.1025-1035, 2010.
- TSIGOS, I.; MARTINO, A.; KAFETZOPOULOS, D.; BOURIOTIS, V. Chitin deacetylases: new versatile tools in biotechnology. **Tibtech**, v.18, 2000.
- TULEVA, B.; CHRISTOVA, N.; COHEN, R.; ANTONOVA, D.; TODOROV, T.; STOINEVA, I. Isolation and characterization of trehalose tetraester biosurfactants from a soil strain *Micrococcus luteus* BN56. **Process Biochemistry**, v.44, p.135-141, 2009.
- TYAGI, M.; FONSECA, M. M. R.; CARVALHO, C. C. C. R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation**, v.22, n.2, p.231-241, 2010.
- VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.24, p.604-620, 2006.
- VANNUCCI, M. **Os Manguezais e Nós: Uma Síntese de Percepções**. São Paulo: Edusp, 1999, 233 p.
- WARNER, S.A.J. **Genomic DNA Isolation and lambda Library Construction in Plant Gene Isolation: Principles and Practice** edited by Foster, G.D and Twell, D, John Wiley & Sons Ltd, 1996, p.51-73.
- WENTWORTH, C. K. A scale of grade and class terms for clastic sediments. **Journal of Geology**, v.30, p.377-392, 1922.
- WHITE, D.C.; PINKART, H.C.; RINGELBERG, A.B. **Biomass Measurements: Biochemical Approaches**. In **Manual of Environmental Microbiology**, C.J. Hurst, G.R. Knudson, M.J. McInerney, L.D. Stetzenbach, and M.V. Walter (Eds.). Washington: ASM Press, DC, 1997, p.91-101.
- WHITE, J.; GILBERT, J.; HILL, G.; HILL, E.; HUSE, S. M.; WEIGHTMAN, A. J.; MAHENTHIRALINGAM, E. Culture-independent analysis of bacterial fuel contamination provides insight into the level of concordance with the standard industry practice of aerobic cultivation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.13, p.4527-4538, 2011.
- WINSOR, P.A. Solvent Properties of Amphiphilic Compounds, Butterworths. **Scientific Publication**, London, 1954.
- WOODWARD, J. Methods of immobilization of microbial-cells. **Journal of Microbiology Methods**, v.8, p.91-102, 1988.
- YANG, C. H.; CROWLEY, D. E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.1, p.345-351, 2000.
- YONG, Y.; BAIPENG, P.; GUANGCHENG, C.; YAN, C. Processes of organic carbon in mangrove ecosystems. **Acta Ecologica Sinica**, v.31, p.169-173, 2011.

YU, S. H.; KE, L.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Y. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. **Environment International**, v.31, p.149-154, 2005.

ZAKI, N. N.; ABDEL-RAOUF, M. E.; ABDEL-AZIM, A. A. Propylene oxide-ethylene oxide block copolymers as demulsifiers for water-in-oil emulsions, I. Effect of molecular weight and hydrophilic-lipophilic balance on the demulsification efficiency. **Monatshefte für Chemie**, v.127, p.621-629, 1996.

ZHOU, H. W.; LUANC, T. G.; ZOUB, F.; TAM, N. F. Y. Different bacterial groups for biodegradation of three- and four-ring PAHs isolated from a Hong Kong mangrove sediment. **Journal of Hazardous Materials**, v.152, p.1179-1185, 2008.