



**CENTRO DE ESTUDOS GERAIS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MARINHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MARINHA - MESTRADO
PRH-11**



NATASCHA KREPSKY

***PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR
CONSÓRCIOS BACTERIANOS
HIDROCARBONOCLÁSTICOS***

**NITERÓI
2004**

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MARINHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MARINHA

Produção de biossurfactantes por consórcios *bacterianos* *hidrocarbonoclásticos*

NA TASHA KREPSKY

ORIENTAÇÃO: PROF^a DR^a MIRIAN A. C. CRAPEZ

NITERÓI

2004

1µm



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MARINHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MARINHA

Produção de biossurfactantes por consórcios bacterianos hidrocarbonoclásticos

NATASCHA KREPSKY

Dissertação apresentada ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Marinha.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2004 pela banca examinadora:

Mirian Araújo Carlos Crapez/ UFF

Lucy Seldin/ UFRJ

Luiz Sérgio Radino Lamego/ UFF

“Fazer aquilo que você gosta,
é liberdade,
gostar daquilo que você faz,
é felicidade.”

Turma Zagaia

FI CHA CATALOGRÁFI CA

KREPSKY, Natascha

Produção de biossurfactantes por consórcios bacterianos hidrocarbonoclasticos. Niterói, Programa de Pós-Graduação em Biologia Marinha/ Natascha Krepsky. – Niterói: [s.n.], 2004.

139 p.

Dissertação: Mestrado em Biologia Marinha.
Universidade Federal Fluminense, 2004.

ÍNDICE DE TEXTO

AGRADECIMENTOS	18
RESUMO	20
ABSTRACT	22
INTRODUÇÃO	
1. A poluição por petróleo nos oceanos	24
2. Microrganismos na recuperação ambiental	29
3. O que é um surfactante?	31
4. Biossurfactantes bacterianos	36
5. Biofilme no ambiente	38
6. Área de coleta de microrganismos	40
OBJETIVOS	44
MATERIAIS E MÉTODOS	
1. Isolamento do Consórcio de bactérias hidrocarbonoclásticas	
1.1. Coleta de sedimento	45
1.2. Coleta da água do mar	45
1.3. Seleção de consórcios de bactérias hidrocarbonoclásticas	46
2. Triagem de consórcios hidrocarbonoclásticos potencialmente produtores de biossurfactante	
2.1. Semeadura em meio sólido para a separação das bactérias dos consórcios	47
2.2. Verificação da produção de biofilme e teste do colapso da gota	47
3. Amplificação e manutenção dos consórcios bacterianos potencialmente produtores de biossurfactantes	48
4. Caracterização dos consórcios	
4.1. Teste de esporulação	48
4.2. Características nutricionais	49
5. Ensaio preliminares para a determinação da biomassa surfactante	
5.1. Quantificação bacteriana em 5 dias	50
5.1.1. Quantificação das células bacterianas por epifluorescência	51
5.1.2. Determinação do carbono bacteriano	52
5.2. Acompanhamento da biomassa e produção de surfactante por 15 dias	52
6. Estudo das condições para a produção de biossurfactantes	
6.1. Salinidade	54

6.2. Tempo de incubação	55
6.3. Tipo de Frasco e Oxigenação	55
7. Análise da eficiência do biossurfactante	56
8. Microscopia Eletrônica de Varredura	57
9. Análise estatística dos dados	58
RESULTADOS	
1. Isolamento do consórcio de bactérias hidrocarbonoclásticas	59
2. Triagem de consórcios hidrocarbonoclásticos potencialmente produtores de biossurfactante	59
3. Amplificação e manutenção dos consórcios bacterianos potencialmente produtores de biossurfactantes	60
4. Caracterização dos consórcios	
4.1. Teste de esporulação	61
4.2. Características nutricionais	61
5. Ensaio preliminar para a determinação da biomassa surfactante	
5.1. Quantificação bacteriana em 5 dias	62
5.2. Acompanhamento da biomassa e produção de biossurfactante por dias	15 64
6. Estudo das condições para a produção de biossurfactantes	
6.1. Salinidade	66
6.2. Tempo de incubação	67
6.3. Tipo de Frasco e Oxigenação	71
7. Análise da eficiência do biossurfactante	77
8. Microscopia Eletrônica de Varredura	78
DISCUSSÃO	83
CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS	98
ANEXO I Tabelas: Primeira etapa	103
ANEXO II a: Tabelas e Gráficos: Tempo de incubação	105
ANEXO II b: Tabelas e Gráficos: Influência Frascos e Oxigênio	112
ANEXO III: Tabelas Eficiência do surfactante	135
ANEXO IV: Ilustrações	136
ANEXO V: Siglas e abreviaturas empregadas	139

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Molécula de Surfactante não iônico	31
Fig. 2. Alinhamento do surfactante na interface entre água e óleo	33
Fig. 3. a) Óleo com água, b) Óleo com água e íons de sal	33
Fig. 4. Esquematização do sistema de microemulsão Winsor tipo I, III e II	34
Fig. 5. Representação de (a) micelas esféricas formadas por (b) óleo na água e (c) inversas de água no óleo	35
Fig. 6. Mapa da Baía de Guanabara, mostrando as áreas atingidas pelo derramamento de petróleo de 2000	43
Fig. 7. Mangue de Guapimirim, São Gonçalo, RJ.	45
Fig. 8. Praia de Itacoatiara, Niterói, RJ.	46
Fig. 9. Frascos utilizados para os ensaios. Erlenmeyer e Wheaton.	56
Fig. 10. Placa de Petri contendo Agar Congo para ilustrar a coloração rosa-avermelhada das colônias do consórcio 1.	60
Fig. 11 – Número de endósporos dos consócios produtores de surfactante ao longo de 5 dias.	63
Fig. 12 – Carbono bacteriano dos consócios produtores de surfactante ao longo de 5 dias.	64

Fig. 13– Carbono bacteriano dos consórcios de produtores de surfactante com 0, 6 e 15 dias de incubação ($p < 0,05$). _____	66
Fig. 14– Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 3 ao longo de 30 dias (T 15; $r = -1,0$; $p < 0,05$). _____	68
Fig. 15 – Taxa de emulsificação (TE%) do Árabe Leve e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do consórcio AL 3 ao longo de 30 dias. _____	69
Fig. 16 - Taxa de emulsificação (TE) do Árabe Leve e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 1 controle ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton. _____	74
Fig. 17 - Taxa de emulsificação (TE) do Árabe Leve e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 3 controle ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton. _____	74
Fig. 18 – Tensão de Superfície (mN.m^{-1}) dos consórcios incubados por 15 dias em meio de cultura com 25 e 50% de água do mar ($p < 0,05$). _____	77
Fig. 19- Fotografia em MEV do biofilme formado pelo AL1 em lamínula de vidro após 15 dias de incubação. _____	79
Fig. 20 - Fotografia em MEV do biofilme formado pelo AL2 em lamínula de vidro após 15 dias de incubação. _____	80
Fig. 21 - Fotografia em MEV do biofilme formado pelo AL3 em lamínula de vidro após 15 dias de incubação. _____	81
Fig. 22 - Fotografia em MEV do biofilme formado pelo S1 em lamínula de vidro após 15 dias de incubação. Reparar a “rede” formada entre as bactérias. _____	82

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Diversidade nutricional de consórcios em 30 e 60 dias de incubação em variadas fontes de carbono. _____ 62

Tabela 2 – Representação da preferência de emulsificação aquosa (B) ou não aquosa (A) do querosene, gasolina e Árabe Leve ao longo do tempo para os consórcios. _____ 71

Tabela 3 – Comparação dos valores de TE dos consórcios controle (c) e com óleo mineral (o) incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias em frascos Wheaton analisados pelo teste T ($p < 0,05$). _____ 72

Tabela 4 – Comparação do CB dos consórcios controle e com óleo mineral incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias em frascos Wheaton analisados pelo teste T ($p < 0,05$). _____ 73

Tabela 5 – Representação da preferência de emulsificação aquosa (B) ou não aquosa (A) do querosene, gasolina e Árabe Leve ao longo do tempo para os consórcios inoculados em Erlenmeyer ($p < 0,05$ pelo teste T). _____ 75

Tabela 6 – Representação da preferência de emulsificação aquosa (B) ou não aquosa (A) do querosene, gasolina e Árabe Leve ao longo do tempo para os consórcios inoculados em Wheaton ($p < 0,05$ pelo teste T). _____ 76

ÍNDICE DOS ANEXOS

Tabelas

Tabela 1 – Quantificação de endósporos dos consórcios produtores de surfactantes por cm^{-3} ao longo de 5 dias. _____ 103

Tabela 2 - Carbono bacteriano dos consórcios produtores de surfactantes em $\mu\text{g C. cm}^{-3}$ ao longo de 5 dias. _____ 103

Tabela 3 - Taxa de emulsificação da gasolina, querosene e Árabe Leve por consórcios isolados de sedimento de mangue com 6 e 15 dias de incubação. _____ 103

Tabela 4 - Taxa de emulsificação não aquosa A (%) da gasolina, querosene e Árabe Leve por consórcios isolados de sedimento de mangue com 6 e 15 dias de incubação. _____ 104

Tabela 5 - Taxa de emulsificação aquosa B (%) da gasolina, querosene e Árabe Leve por consórcios isolados de sedimento de mangue com 6 e 15 dias de incubação. _____ 104

Tabela 6 – Carbono bacteriano dos consórcios produtores de surfactantes em $\mu\text{g C. cm}^{-3}$ em 6 e 15 dias. _____ 104

Tabela 7 - Taxa de Emulsificação do querosene (TE%) e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ dos consórcios incubados por 30 dias. _____ 105

Tabela 8 - Taxa de Emulsificação não aquosa (A%) e aquosa (B%) do querosene pelos consórcios incubados por 30 dias. _____ 105

Tabela 9 - Taxa de Emulsificação da gasolina (TE%) e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ pelos consórcios incubados por 30 dias. _____ 106

Tabela 10 - Taxa de Emulsificação não aquosa (A%) e aquosa (B%) da gasolina pelos consórcios incubados por 30 dias.	106
Tabela 11- Taxa de Emulsificação do Árábe Leve (TE%) e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ pelos consórcios incubados por 30 dias.	107
Tabela 12- Taxa de Emulsificação não aquosa (A%) e aquosa (B%) do Árábe Leve pelos consórcios incubados por 30 dias.	108
Tabela 13- Taxa de emulsificação (TE %) do querosene e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{g C. cm}^{-3}$ pelos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias Erlenmeyer.	112
Tabela 14 - Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ pelos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias Wheaton.	112
Tabela 15- Taxa de emulsificação não aquosa (A) e aquosa (B) do querosene pelos consórcios incubados por 0, 6, 15 e 30 dias em Erlenmeyer.	113
Tabela 16 - Taxa de emulsificação não aquosa (A) e aquosa (B) do querosene pelos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias em Wheaton.	113
Tabela 17 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) $\mu\text{gC cm}^{-3}$ dos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias em Erlenmeyer.	114
Tabela 18- Taxa de emulsificação (TE) da gasolina carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ dos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias Wheaton.	114
Tabela 19 - Taxa de emulsificação não aquosa (A) e aquosa (B) da gasolina pelos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias em Erlenmeyer.	115
Tabela 20 - Taxa de emulsificação não aquosa (A) e aquosa (B) da gasolina pelos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias em Wheaton.	115

Tabela 21- Taxa de emulsificação (TE) do Árape Leve e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ dos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias Erlenmeyer. _____ 116

Tabela 22- Taxa de emulsificação (TE) do Árape Leve e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ dos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias em Wheaton. _____ 116

Tabela 23 - Taxa de emulsificação não aquosa (A) e aquosa (B) do Árape Leve pelos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias em Erlenmeyer. _____ 117

Tabela 24 - Taxa de emulsificação não aquosa (A) e aquosa (B) do Árape Leve pelos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias em Wheaton. _____ 117

Tabela 25 – Densidade (mPa) dos consórcios utilizados para medida de tensão superficial, incubados por 15 dias em meio de cultura com 25% e 50% de água do mar. _____ 133

Tabela 26 - Tensão de Superfície (mN/m) dos consórcios AL1, 2 e 3 incubados por 15 dias em meio de cultura com 25% ou 50% de água do mar. _____ 135

ÍNDICE DOS ANEXOS

Figuras

- Fig. 1 – Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do consórcio AL1 ao longo de 30 dias. _____ 108
- Fig. 2 – Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do consórcio AL2 ao longo de 30 dias. _____ 108
- Fig. 3– Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do consórcio AL1 ao longo de 30 dias. _____ 109
- Fig. 4 – Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do consórcio AL 2 ao longo de 30 dias. _____ 109
- Fig. 5 – Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do consórcio AL 3 ao longo de 30 dias. _____ 110
- Fig. 6- Taxa de emulsificação (TE%) do Árabe Leve e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do consórcio AL1 ao longo de 30 dias. _____ 110
- Fig. 7– Taxa de emulsificação (TE%) do Árabe Leve e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do consórcio AL 2 ao longo de 30 dias. _____ 111
- Fig. 8- Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 1 controle em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação. _____ 118
- Fig. 9- Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 1 com óleo mineral em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação. _____ 118
- Fig. 10 - Taxa de emulsificação do querosene (TE) e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 2 controle em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação. _____ 119

- Fig. 11- Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 2 com óleo em Erlenmeyer mineral ao longo de 30 dias de incubação. _____ 119
- Fig. 12- Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 3 controle em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação. _____ 120
- Fig. 13- Taxa de emulsificação (TE%) do querosene e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 3 com óleo mineral em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação. _____ 120
- Fig. 14- Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) do AL 1 controle ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton. _____ 121
- Fig. 15- Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) do AL 1 com óleo mineral ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton. _____ 121
- Fig. 16- Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) do AL 2 controle ao longo de 30 dias de incubação em Wheaton. _____ 122
- Fig. 17- Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) do AL 2 com óleo mineral ao longo de 30 dias de incubação em Wheaton. _____ 122
- Fig. 18- Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) do AL 3 controle ao longo de 30 dias de incubação em Wheaton. _____ 123
- Fig. 19- Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) do AL 3 com óleo mineral ao longo de 30 dias de incubação em Wheaton. _____ 123
- Fig. 20 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 1 controle em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação. _____ 124
- Fig. 21 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 1 com óleo mineral em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação. _____ 124

- Fig. 22 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 2 controle em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação. _____ 125
- Fig. 23 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 2 com óleo mineral em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação. _____ 125
- Fig. 24 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 3 com controle em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação. _____ 126
- Fig. 25 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 3 com óleo mineral em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação. _____ 126
- Fig. 26 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) do AL 1 controle ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton. _____ 127
- Fig. 27 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) do AL 1 com óleo mineral ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton. _____ 127
- Fig. 28 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) do AL 2 controle ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton. _____ 128
- Fig. 29 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) do AL 2 com óleo mineral ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton. _____ 128
- Fig. 30 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) do AL 3 controle mineral ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton. _____ 129
- Fig. 31 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) do AL 3 com óleo mineral ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton. _____ 129
- Fig. 32 - Taxa de emulsificação do Árabe Leve (TE) e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 1 controle em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação. _____ 130

- Fig. 33- Taxa de emulsificação (TE) do Árabe Leve e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 1 com óleo mineral em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação. _____ 130
- Fig. 34- Taxa de emulsificação do Árabe Leve (TE) e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 2 controle em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação. _____ 131
- Fig. 35- Taxa de emulsificação do Árabe Leve (TE) e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 2 com óleo mineral em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação. _____ 131
- Fig. 36- Taxa de emulsificação do Árabe Leve (TE) e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 3 controle em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação. _____ 132
- Fig. 37- Taxa de emulsificação (TE) do Árabe Leve e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 3 com óleo mineral em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação. _____ 132
- Fig. 38- Taxa de emulsificação (TE) do Árabe Leve e carbono bacteriano (CB) do AL 1 em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ com óleo mineral ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton. _____ 133
- Fig. 39- Taxa de emulsificação (TE) do Árabe Leve e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 2 controle ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton. _____ 133
- Fig. 40- Taxa de emulsificação (TE) do Árabe Leve e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 2 com óleo mineral ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton. _____ 134
- Fig. 41 - Taxa de emulsificação (TE) do Árabe Leve e carbono bacteriano (CB) do AL 3 em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ com óleo mineral ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton. _____ 134
- Fig. 42- Fluxograma da metodologia empregada para isolamento de consórcios hidrocarbonoclásticos produtores de biossurfactante. _____ 136
- Fig. 43- Microscopia de epifluorescência com fluorocromo vermelho de acridina do AL1 com 24h (a), 48h (b) e 72h (c), em aumento 1.000 x. Estruturas coradas em vermelho representam as cápsulas. _____ 137

Fig. 44. Ensaio TE. Tubos contendo meio de cultura com surfactante produzido por consórcio bacteriano hidrocarbonoclástico em presença de derivados do petróleo: (a) gasolina, (b) querosene e (c, d) Árabe Leve, mostrando a emulsificação dos compostos hidrofóbicos. Notar o desaparecimento da fase aquosa no (d)._____ 138

AGRADECIMENTOS

A colaboração de inúmeras pessoas foi imprescindível para o sucesso da conclusão desta dissertação. Portanto, agradeço o esforço de todos que participaram, destacando:

Primeiramente, Deyse Vallim que me “apresentou” o telefone da sua irmã Magui. Estes últimos dois anos de minha vida se devem à Magui, que, com toda sua delicadeza e carinho me indicou à Mirian e passou informações sobre a área ambiental. Elas foram as principais responsáveis por eu ter chegado na Biologia Marinha;

À minha querida orientadora Mirian Crapez por ter acreditado em meu potencial, me recebendo de braços abertos em sua “família”, me incentivando e cobrindo com todo seu carinho. Com ela aprendi que a relação entre Orientador e Orientando não precisa ser marcada pela cobrança, mas sim pela amizade, sempre nos aconselhando na vida e na pesquisa, nos mostrando o fiel significado da palavra “orientar”;

À família da Microbiologia Marinha que também me acolheu de braços abertos, aos amigos: Fred, dupla de labuta, dedicado e hiper-ativo, sempre encontrando tempo para ajudar e resolver as nossas “pendengas”; Luiz Fontana, parceiro de dupla, sempre animado e dando seu “jeitinho” quando tudo parecia perdido; Graça me mostrou que antes de alunos somos humanos e a qualquer momento podemos passar por difíceis provas, mas com a ajuda dos amigos e determinação é possível conquistar nossa meta maior; Daniela, Mabel e Fernanda Queiróz, pela companhia, ajuda e amizade; Leandro, José Augusto e Fernanda Savergini;

Aos companheiros de turma Jabuca, Daniela, Carla, Uâni, Aline, Renata, Leonardo, pela companhia e festinhas e aos amigos Rosana e Luis Caetano, que foram fonte de inspiração na perseverança que ambos tiveram para seguir seus sonhos;

À Eunice, pela simpatia, dedicação e presteza com que realiza nossos pedidos;

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Marinha pela atenção e dedicação que nos passaram seus conhecimentos, ao Professor Cleverson Guizan, pela paciência com que recebia as 505 ligações que fizemos durante estes anos para saber da Bolsa ou da Taxa de Bancada;

Aos Professores Luiz Sérgio Lamego e Rosana Martins, pelo carinho, paciência, dedicação e maravilhosa colaboração;

Aos Professores Alexandre Rosado e Ulisses Casado Lins, pela ajuda, colaboração e tempo dispensado;

À Professora Kátia Regina Netto dos Santos, pela minha formação que hoje compreendo, respeito e agradeço e ao Professor Fernando Costa e Silva, pelas palavras e ações que me fizeram rever minhas metas;

Ao Professor Osvaldo Bárcia do Laboratório de Físico-Química de Líquidos e eletroquímica – Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro pela disponibilização do laboratório e de seus equipamentos/aparelhos.

Às minhas queridas amigas Fabianne, Beatriz e Silvia, meus pilares de sustentação que desde a infância continuam comigo, me ajudando a levantar, enxergar e pensar quando tudo parece meio confuso;

Ao Fausto que me acompanhou e me incentivou quando tudo isso não passava de um grande sonho;

Aos meus pais, que nunca me deixaram desistir e sempre estiveram me dando todo o suporte necessário, desde os tempos de colégio, para que eu estudasse e me formasse;

Às minhas queridas vovós Júlia, que ajudou a me criar e Carmem;

À minha querida irmã Karla que sempre me instigou a querer mais, me “acordando” na hora exata, ao meu irmão Paulo Ricardo e cunhada Leonora pelas dicas criativas, à Rosane pelo zelo, carinho e tranquilidade que sempre me tratou e à Denise, pela sinceridade;

À minha mania de saber de todas as possibilidades antes de entrar de cabeça;

À Agência Nacional do Petróleo, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Uma vez no sedimento, o petróleo irá persistir por longos períodos caso não seja degradado pelos organismos locais. Biossurfactantes, produzidos em resposta a hidrocarbonetos, são fundamentais para o crescimento bacteriano nas gotas de óleo, além de facilitar a biorremediação de hidrocarbonetos com baixa solubilidade em água. Tendo em vista a utilização de técnicas para a rápida e eficiente limpeza, sem causar maiores danos à biota envolvida, propusemos este trabalho de implementação da produção de surfactante por bactérias marinhas hidrocarbonoclásticas. Dessa forma, consórcios bacterianos hidrocarbonoclásticos de sedimento superficial de mangue impactado por petróleo, foram isolados e os produtores de surfactante foram selecionados e mantidos em laboratório. Os consórcios foram caracterizados pela presença de endósporos e seu desempenho bioquímico, sua capacidade de produção de biofilme foi acompanhada e fotografada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise da eficiência do biossurfactante (tensão de superfície - TS) e o estudo das condições para produção deste foram realizados com a metodologia padronizada, taxa de emulsificação (TE), taxa de emulsificação aquosa (B) e não aquosa (A) da gasolina, querosene e Árabe Leve e a determinação do carbono bacteriano (CB) ao longo de 70 dias e comparando as condições de aeração em dois frascos diferentes. Nossos consórcios foram capazes de emulsionar todos os

compostos, havendo aumento da produção do biossurfactante ao longo do tempo, apesar do tipo de emulsificação (A e B) para cada composto não variar com o tempo, mas com sua composição. Houve preferência da emulsificação A para a gasolina e o querosene e da emulsificação B para o Árabe Leve. O Erlenmeyer foi o frasco com o melhor crescimento bacteriano e TE. Os consórcios mantidos em Árabe Leve apresentaram maior capacidade de emulsificação que aqueles em sacarose. As células apresentaram superfície hidrofóbica, fundamental para a aderência ao óleo. Sendo assim, a metodologia se mostrou adequada para o isolamento de bactérias produtoras de surfactante, permitindo selecionar estes consórcios baseado nas características das colônias.

ABSTRACT

If the petroleum is not degraded by local organisms, it will persist in the sediments for long periods. Biosurfactants produced as a result of hydrocarbons contact are essential for bacterial growth on the oil droplets, and also facilitate low water-solubility hydrocarbon bioremediation. This work aimed the search for techniques for a fast and efficient cleaning, implementing biosurfactant production by hydrocarbonoclastic bacteria. Mixed hydrocarbon-degrading bacteria were isolated from superficial mangrove sediment contaminated with petroleum. The surfactant producers were selected and maintained at the laboratory. The mixed bacteria were characterized biochemically and by endospores presence, the capacity of biofilm production was accessed and illustrated by scanning electron microscopy (SEM). The efficiency of the biosurfactant (surface tension - ST) and its production conditions were assayed by the established methodology: gasoline, kerosene and Arabian Light emulsification index (E), aqueous (B) and non-aqueous (A) emulsification index, bacterial carbon determination (BC) during a 70 days period and comparing the aeration condition on two different flasks. Our mixed bacteria emulsified all the petroleum derivatives, with biosurfactant production increase with time, although the type of emulsification A or B changed with its composition but not with time. Gasoline and kerosene were mainly emulsified at A phase, and Arabian Light at B phase. Erlenmeyer was the flask with better bacterial growth and

emulsification index. The mixed bacteria maintained at Arabian Light showed higher emulsification capacity than sucrose. The cells presented hydrophobic surface that is essential for oil adhesion. Thus, the methodology applied were indicated for the isolation of surfactant producer bacteria, and allowed their isolation based on its colony morphology characteristics.

INTRODUÇÃO

1- A poluição por petróleo e os Oceanos

Poluição marinha é a introdução direta ou indireta de substâncias ou energia ao ambiente marinho pelo homem, resultando em efeitos deletérios como danos a recursos vivos e à saúde humana, obstáculo às atividades marinhas incluindo a pesca e a diminuição da qualidade de água do mar para uso e aumento da hostilidade do ambiente, segundo as organizações internacionais “United Nations Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution” e “The International Commission for Exploration of the Sea” (Lalli & Parsons, 1992).

Há muito o oceano tem sido considerado como local para descarte de resíduos pela sociedade, equivocada pelo pensamento da sua infinita capacidade de absorção/diluição. Diariamente, um grande número de poluentes aporta aos oceanos, aumentando as concentrações naturais, já que algumas dessas substâncias também ocorrem no ambiente marinho (Lalli & Parsons, 1992).

Os poluentes podem se decompor ou serem atenuados pelo grande volume dos oceanos, enquanto outros podem causar impactos significantes, mesmo em pequenas quantidades. Dentre os poluentes antropogênicos mais freqüentes temos os plásticos, os pesticidas e compostos relacionados, metais pesados,

esgoto, lixo radioativo, efluentes térmicos e hidrocarbonetos de petróleo, que serão o foco desse trabalho de dissertação (Nybakken, 1992; Lalli & Parsons, 1992).

O petróleo é formado por processos naturais que ocorrem no sedimento marinho, sendo uma mistura de compostos orgânicos gasosos, líquidos e sólidos. Grande parte do óleo cru e refinado possui hidrocarbonetos divididos em quatro classes: *n*-alcanos ou parafinas, isoparafinas ou alcanos ramificados, cicloalcanos e aromáticos. (Lalli & Parson, 1992; Libes, 1992 e Crapez, 2001).

Sua presença nos oceanos pode resultar primariamente do vazamento de óleo cru de plataformas de petróleo, de acidentes envolvendo navios tanque (12% dos casos na década de 80) ou de origem natural. Algumas regiões como “Coal Oil Point” na Califórnia estão sujeitas à contaminação natural por petróleo (Nybakken, 1992)

O destino do petróleo nos oceanos dependerá da composição química, de seu estado, da velocidade dos ventos, da temperatura, da geologia do fundo marinho e da costa e da atividade biológica local. Em uma superfície calma, um derramamento formará inicialmente uma imensa mancha de óleo, sujeita a processos físicos como advecção e turbulência, podendo, respectivamente, levar a dispersão ou emulsão (também conhecida por “mousse de chocolate”) do óleo (Nybakken, 1992; Libes, 1992; Michel 2000).

Os compostos com baixo peso molecular tendem a evaporar ou dissolver, podendo também ser foto-oxidados. O óleo pesado, porém, é um óleo persistente, evaporando apenas 5 a 10%. Com o passar do tempo, pela ação das condições ambientais (“weathering”), a viscosidade e a densidade do petróleo vão aumentando, podendo então ser transportado horizontalmente pela corrente ou verticalmente pelo afundamento. O petróleo pode ser carregado ao fundo marinho como resultado da adsorção às partículas depositantes ou pela incorporação à matéria orgânica particulada (MOP), através da ação biológica. Uma vez no sedimento, os compostos de petróleo irão persistir por longos períodos se não forem degradados pelos organismos locais. Como a maioria destes compostos são tóxicos ao bentos, estes não são rapidamente degradados, vindo a causar impacto na biogeoquímica dos sedimentos superficiais até o petróleo ser enterrado (Libes, 1992).

A ação das condições ambientais sobre o óleo dificulta a limpeza do ambiente. Para que a remoção seja efetiva esta deve ser iniciada logo após o derrame. Cada ambiente como praias, costão rochoso e mangue, entre outros, deve receber uma ação específica. A composição do óleo envolvido e o tempo após o derrame também são importantes para determinar a ação a ser empregada (Michel, 2000).

As praias estão sujeitas a re-contaminação pelo óleo. Existindo manchas de óleo na água, estas serão levadas novamente à praia pela ação das marés.

Costões rochosos podem servir como fonte de contaminação para outros locais, pois o óleo fica preso às pedras, sendo liberado aos poucos com a ação das marés. A prática comum nos Estados Unidos e outros países para limpeza de superfícies rígidas, como pedras e construções, com baixa diversidade intertidal é o uso de jato de água quente em alta pressão. Esta prática não é aconselhável para locais com rica biodiversidade intertidal, uma vez que a não limpeza se mostrou menos danosa aos organismos. A aplicação de sorbentes ao redor da região de fluxo pode ser interessante para retirar o óleo liberado pelo costão (Michel, 2000).

Em manguezais, os danos causados pelo petróleo são os mais críticos, uma vez que pela ação da maré, o óleo cobre as raízes dos mangues impedindo a respiração das plantas, acarretando em morte e a conseqüente erosão da área pela ausência de barreiras físicas que bloqueiem o sedimento carregado pela maré vazante. Nesses ambientes a miríade de ação é limitada, sendo recomendada, na maior parte dos casos, a recuperação natural, por causar menos impacto que outras técnicas, como apontadas a seguir. A remoção manual do óleo acumulado não é recomendada por causar grande impacto no ambiente. A aplicação de sorbentes é recomendada em locais onde há mobilização do óleo por ação das marés, tomando precauções para evitar maiores danos às raízes. A inundação requer que o grupo responsável entre no mangue e direcione o fluxo de água, sendo indicado para condições em que há manchas de óleo livres na superfície. O

jato de baixa pressão é eficiente na retirada de óleo das raízes dos mangues, mas esta técnica tem tempo de ação limitado, dependendo da densidade e viscosidade do óleo. A aplicação de dispersantes é uma estratégia muito empregada atualmente, mas deve ser levada em conta a toxicidade do composto e sua persistência no ambiente. Outra técnica promissora é a biorremediação, através do enriquecimento ou introdução de bactérias hidrocarbonoclasticas ao local impactado sem causar maiores danos ao ambiente (Duke *et al.*, 2000; Michel, 2000).

O acúmulo de compostos lipofílicos na membrana dos microrganismos tem efeitos consideráveis nas propriedades estruturais e funcionais das membranas. Como resultado deste acúmulo, a membrana perde sua integridade, podendo ser observado um aumento na permeabilidade de prótons e íons (Sikkema *et al.*, 1995). A fauna marinha tende a bioacumular uma variedade de poluentes como metais, pesticidas e hidrocarbonetos do petróleo em seus tecidos, dependendo da concentração destes na água do mar. O acúmulo do poluente pode ser causado por adsorção passiva da água do mar ou por retirada ativa, seguida pela retenção nos tecidos e/ou em partes rígidas, como resultado da não excreção deste produto. Alguns poluentes podem ser excretados ou degradados, porém as taxas desses processos tendem a ser baixas. Desta forma, o consumo de tecidos contaminados gera a bioacumulação de poluentes nos níveis tróficos superiores causando a biomagnificação, levando a maiores concentrações do

poluente nos organismos do topo da cadeia alimentar. A exposição dos organismos marinhos a doses subletais do poluente pode interferir nos processos metabólicos como a reprodução, percepção de estímulos químicos, podendo levar à hipotermia ou afogamento por interferir nas propriedades de isolamento térmico das penas e impedir o vôo/ natação das aves (Libes, 1992).

A biorremediação é o uso intencional do processo de biodegradação para eliminar poluentes ambientais dos locais onde foram introduzidos. Neste processo, são utilizados microrganismos capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia, eliminando os poluentes do local. Para remediar o poluente ambiental, sua concentração deve ser reduzida a níveis aceitáveis pelas agências reguladoras (Watanabe, 2001).

2- Microrganismos na recuperação ambiental

A transformação microbiana de hidrocarbonetos lineares e cíclicos é importante na natureza e nas aplicações tecnológicas como tratamento de água e de gás, biorremediação e biocatálise. Nesses processos, esses hidrocarbonetos podem estar presentes como poluentes ou como matéria prima para as transformações biológicas e muitos deles podem ser completamente mineralizados pelos microrganismos. A mineralização completa dos hidrocarbonetos lineares e cíclicos pode ser limitada pela biodisponibilidade

destes, que varia de acordo com o peso molecular ou saturação. (Sikkema *et al.*, 1995).

Devido ao alto peso molecular, hidrofobicidade e estado sólido, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) tendem a se adsorver a superfícies. Tanto os microrganismos que vivem em suspensão quanto os aderidos, utilizam apenas moléculas dissolvidas em seu metabolismo. Dessa forma, a taxa de dissolução é uma medida crítica da biodisponibilidade desse composto em todos os ambientes (Sikkema *et al.*, 1995).

Como apenas as moléculas dissolvidas dos hidrocarbonetos estão disponíveis para o metabolismo intracelular, a transferência de substratos lipofílicos e hidrofílicos ocorrem via dissolução em fase aquosa e subsequente captura (ativa ou passiva) pela célula. O contato direto entre o composto lipofílico e a parte hidrofóbica da membrana celular é prevenida pela presença de parede celular ou de compostos hidrofílicos na membrana externa. O envolvimento de enzimas intracelulares específicas para hidrocarbonetos implica que este deve entrar na célula para ser metabolizado. Essa entrada pode ser proporcionada pela partição destas moléculas na bicamada lipídica da membrana celular (Sikkema *et al.*, 1995).

Biossurfactantes produzidos em resposta a hidrocarbonetos é fundamental para o crescimento bacteriano nas gotas de óleo. Estes facilitam a biorremediação de hidrocarbonetos com baixa solubilidade em água, aumentando a

hidrofobicidade de superfície celular bacteriana, através de ácidos graxos, que promovem sua aderência ao hidrocarboneto emulsificado. Essa adesão parece ser favorecida por interações iônicas como pontes salinas. O surfactante estabiliza também a superfície da gota de óleo emulsificada, permitindo à bactéria aumentar a área exposta ao óleo durante a degradação. A assimilação do óleo por bactérias degradadoras de petróleo deve ocorrer pela fusão de dezenas de nano-emulsões com a membrana externa em gram-negativas e/ou através da retirada pelo complexo óleo-surfactante formado (Southam *et al.*, 2001).

3- O que é um Surfactante?

Os surfactantes são moléculas anfifílicas, compostas de cabeça polar e uma cauda hidrofóbica apolar (Fig.1). Quando colocadas em uma solução de água e óleo, cada uma dessas porções se posiciona espontaneamente na interface entre o óleo e a água para minimizar interações desfavoráveis. A cabeça polar aponta para a água, enquanto a porção apolar para o óleo (Evans *et al.*, 1997).

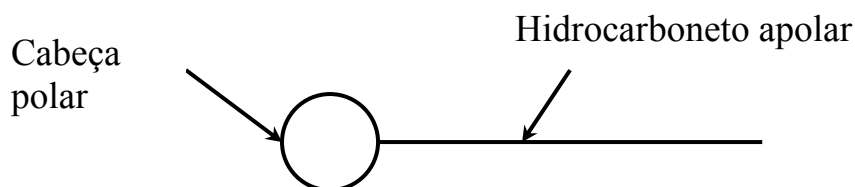


Fig 1. Molécula de surfactante não-iônico (Evans *et al.*, 1997).

Os surfactantes podem ser não-iônicos, aniônicos e catiônicos, dependendo do grupo hidrofílico presente. O componente hidrofóbico consiste de 8 a 18 carbonos, provenientes de gorduras e óleos naturais, frações de petróleo, polímeros e álcoois sintéticos. A eficiência do surfactante é proporcional ao comprimento dessa cadeia. Pelas suas características, facilita a união dos componentes hidrofóbicos formando micelas e permitindo cobrir o material em suspensão. Concentram-se na interface entre a água e o líquido, o gás ou o sólido, pois nestas regiões suas afinidades hidrofóbicas e hidrofílicas estão supridas (Evans *et al.*, 1997).

Surfactantes não-iônicos possuem uma cauda apolar formada por polímeros de hidrocarbonetos e uma cabeça polar. Apesar de não afetar a carga de superfície, aumenta a superfície de absorção na superfície hidrofóbica. Por sua vez, os iônicos possuem cargas associadas a sua cabeça polar (Boek *et al.*, 2002).

Antes da adição dos surfactantes em um sistema contendo óleo e água, as interações entre estes são muito fracas. À medida que as moléculas de surfactante se posicionam na interface óleo-água, a atração entre a água e as cabeças polares aumenta, assim como a atração entre a cadeia hidrofóbica e o óleo (Fig. 2). Essas atrações, por sua vez, reduzem a tensão interfacial entre a água e o composto. Micelas esféricas na presença de uma solução salina formam uma estrutura multilamelar pela atração dos íons das cabeças polares e reduzindo as forças repulsivas entre as cabeças, como apresentado na Fig. 3. Seu tamanho e forma

dependem do tipo do surfactante, da temperatura e da presença de sais (Boek *et al.*, 2002).

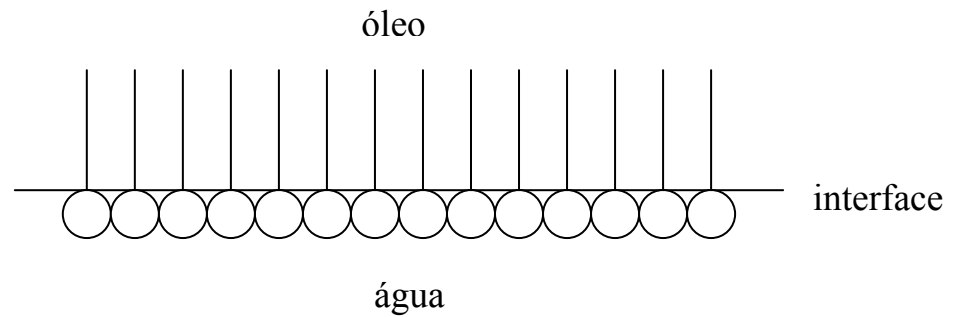
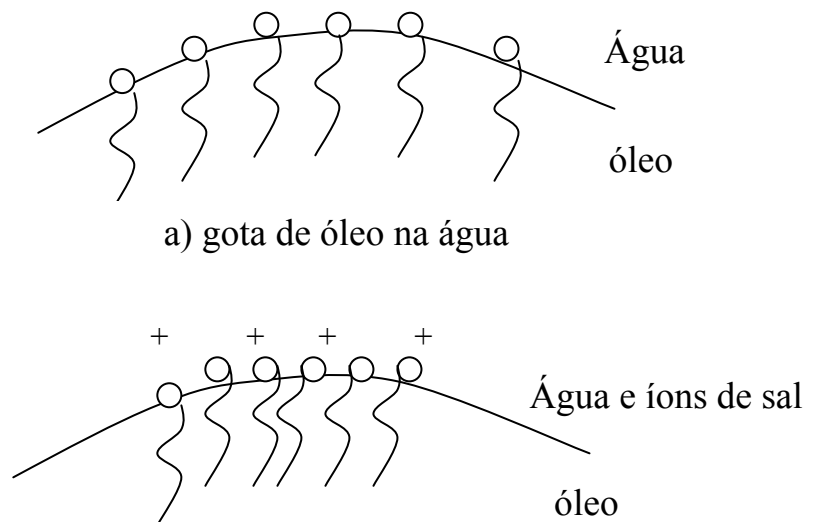


Fig. 2 – Alinhamento do surfactante na interface entre água e óleo (Boek *et al.*, 2002).



b) gota de óleo com água e íons ao redor, reduzindo a área das cabeças polares.

Fig. 3- a) Óleo com água, b) Óleo com água e íons de sal (Boek *et al.*, 2002).

Qualquer fase termodinamicamente estável de um sistema contendo água salgada-óleo-surfactante-cosurfactante (moléculas anfífilicas que auxiliam na propriedade emulsificante dos surfactantes, ex: compostos com álcoois de cadeias longas, benzeno, tetracloro-carbono e nitrobenzeno) em concentrações variáveis é chamada de fase de microemulsão. (Bellocq *et al.*, 1984; Watarai, 1997).

As microemulsões podem existir em equilíbrio com excesso de óleo, água ou ambos. Cada um desses equilíbrios foi classificado por Winsor como tipo I, II e III. Os tipos I e II, respectivamente, são sistemas de duas fases que correspondem a microemulsão de óleo em água (o/a) coexistindo com uma fase de óleo e uma microemulsão de água em óleo (a/o) coexistindo com excesso de água (Fig. 4). O sistema Winsor III é formado quando o surfactante é concentrado na fase do meio, que coexiste com o óleo e a água (Bellocq *et al.*, 1984).

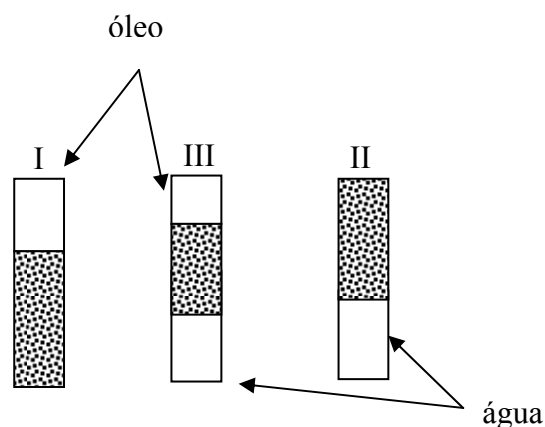


Fig. 4 – Esquematização do sistema de microemulsão Winsor tipo I, III e II (Bellocq *et al.*, 1984).

Como representado na Fig. 5, na região do óleo, microemulsões são formadas por micelas esféricas de água no óleo (a/o). Cada gota de água é envolvida por um filme monolamelar composto por surfactante. Na parte rica em água, microemulsões formam micelas inversas de óleo em água (o/a), suas estruturas são pouco conhecidas apesar de terem sido muito estudadas para água salgada (Bellocq *et al.*, 1984; Evans *et al.*, 1997).

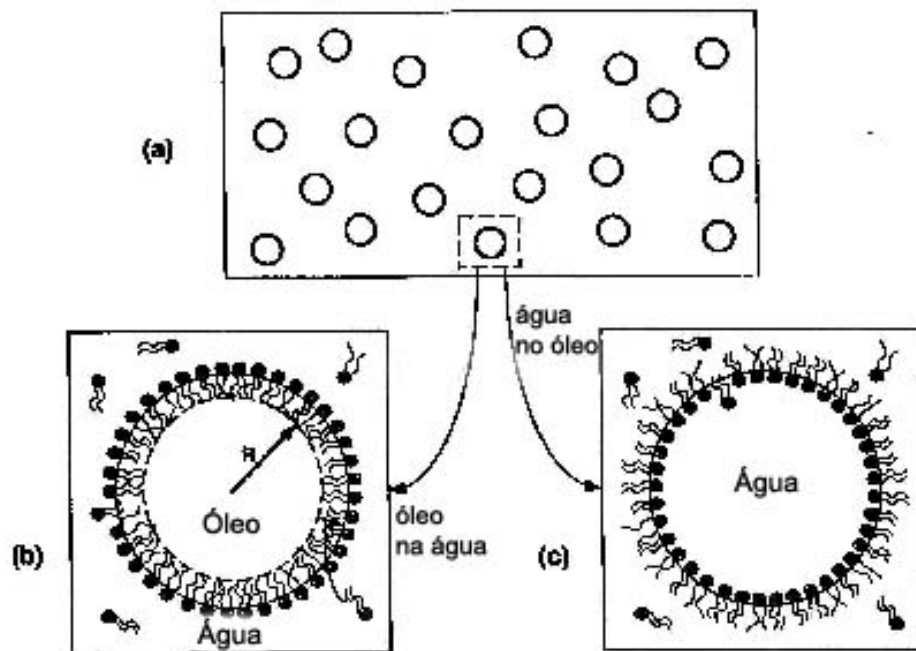


Fig. 5- Representação de (a) micelas esféricas formadas por (b) óleo na água e (c) inversas de água no óleo (Evans *et al.*, 1997).

O aumento da salinidade ou temperatura altera a estabilidade de componentes orgânicos em água, interferindo na separação das fases, resultando na transição de Winsor I => Winsor III => Winsor II. Em alguns casos, o sistema

pode mudar de forma contínua de microemulsão rica em água para uma microemulsão rica em óleo, sem a separação das fases (Bellocq *et al.*, 1984).

4- Biossurfactantes Bacterianos

Graças as suas propriedades físico-químicas, os biossurfactantes são amplamente utilizados como formadores e estabilizantes de emulsões tipo detergente, dispersantes, humectantes, espumantes e anti-espumantes entre outras aplicações, podendo ser empregados na biorremediação, auxiliando na retirada de metais pesados e hidrocarbonetos do ambiente, como matéria prima para perfuração e exploração de poços de petróleo, na emulsão, manipulação e transporte de combustíveis, assim como nas indústrias médico-farmacêuticas, na produção de sabonetes e cosméticos e na de materiais de construção e de alimentos (Bognolo, 1999; Mulligan *et al.* 2001).

Comparados aos surfactantes não biogênicos, os biossurfactantes têm maior tolerância à variação de pH, temperatura e salinidade, estabilidade química, menos tóxicos, mais seletivos, mais eficientes na biodisponibilização dos compostos hidrofóbicos e biodegradáveis, existindo ainda a possibilidade de serem produzidos *in situ* pelos microrganismos que utilizariam os contaminantes orgânicos como substrato para crescimento (Bognolo, 1999; Mulligan *et al.*, 2001; Rahman *et al.*, 2002, Ron & Rosenberg, 2002).

Ao contrário dos surfactantes sintéticos, somente encontramos biossurfactantes aniônicos ou não catiônicos e em raríssimos casos, grupamentos ricos em nitrogênio podem dar um caráter catiônico a essas moléculas. A porção lipofílica pode ser uma proteína ou um peptídeo, com grandes cadeias hidrofóbicas, mas como nos sintéticos, geralmente é uma cadeia de ácidos graxos com 8 a 18 carbonos, enquanto a porção hidrofílica pode ser um grupo éster, uma hidroxila, um fosfato, um ácido carboxílico ou um carboidrato (Bognolo, 1999).

As bactérias produzem moléculas com baixo peso molecular que eficientemente reduzem a tensão de superfície e a tensão interfacial do sistema onde são adicionados. Os biossurfactantes com baixo peso molecular são geralmente glicolipídeos, com carboidratos ligados a uma longa cadeia alifática ou lipopeptídica. Dentre estes podemos citar os raminolipídeos, lipídeos de trealose, soforolipídeos, que são dissacarídeos com longa cadeia de amino-ácidos acilada ou hidroxí-ácidos graxos. O mais conhecido é o raminolipídio produzido por várias espécies de *Pseudomonas*, que consiste de 2 moles de raminose e ácido β -hidroxidecanóico (Ron & Rosenberg, 2002).

Moléculas com alto peso molecular são produzidos por um grande número de espécies. São compostos de polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou misturas complexas desses biopolímeros. Estes são pouco eficientes na redução da tensão de superfície, mas envolvem eficientemente as gotas de óleo e previnem que estas se liguem a outras gotas, funcionando em

concentrações de 0,01% a 0,001%. O mais conhecido é o bioemulsan produzido por várias estirpes de *Acinetobacter* (Ron & Rosenberg, 2002).

5- Biofilme no ambiente

Devido a forte influência da medicina nas pesquisas microbiológicas, apenas recentemente a importância da diversidade microbiana na colonização de superfícies, seja de dispositivos médico-hospitalares ou no meio ambiente tem sido valorizada, estimulando novas definições de termos até então empregados (Meyer-Reil, 1994; Donlan & Costerton, 2002; Dunne, 2002).

Seguindo esta evolução do pensamento, a definição de biofilme sofreu algumas alterações nos últimos 30 anos. A primeira definição dada por Marshal em 1976 foi de “fibras poliméricas extracelulares muito finas, ancoradas na superfície das bactérias”. Em 1999, biofilme foi definido por Costerton como “comunidade estruturada de células bacterianas dentro de uma matriz polimérica por elas produzidas e aderidas a superfície inerte ou biológica, exibindo taxa de crescimento e nível de transcrição diferentes das planctônicas”.

Dentro do biofilme, os microrganismos estão mais protegidos seja de antimicrobianos naturais, bacteriófagos, amebas fagocíticas, surfactantes, substâncias tóxicas e ameaças ambientais como variação de salinidade,

temperatura, pH e radiação. A matriz extracelular atua como um excelente meio de comunicação entre os microrganismos, pois garante a proximidade de diferentes grupos fisiológicos dependentes metabolicamente. Através da atividade de microrganismos imobilizados, gradientes de compostos orgânicos e inorgânicos são mantidos. Nesses gradientes, substratos são eficientemente utilizados, economizando energia (Meyer-Reil, 1994; Dunne, 2002; Donlan & Costerton, 2002). Essa matriz retém a atividade de enzimas extracelulares em uma área próxima às células, permitindo a utilização eficiente dos produtos das reações enzimáticas. Na degradação inicial de material de alto peso molecular é fundamental a ação de enzimas extracelulares, capazes de hidrolisar moléculas grandes em pequenas subunidades que serão metabolizadas pelas células (Meyer-Reil, 1994).

A população bacteriana marinha prioriza uma vida sedentária associada a superfícies e a outros organismos. Um grande número de microrganismos coloniza os sedimentos ligados às superfícies das partículas. Do ponto de vista ecológico, a colonização de superfícies é vantajosa, pois direciona microrganismos para locais específicos, uma vez que a adesão de uma espécie pode facilitar a adesão de outras espécies, encorajando relações simbióticas muito comuns na natureza, além de ser nutricionalmente favorável, pois os produtos metabólicos de um organismo podem servir de suporte para o crescimento de outros, intensificando o poder de degradação em relação aos

organismos individualizados. Além disso, os microrganismos dos consórcios possuem uma variedade de enzimas que permite a decomposição de substratos dissolvidos e particulados e aceptores finais de elétrons alternativos em caso de anaerobiose (Meyer-Reil, 1994; Bonin *et al.*, 2001; Dunne, 2002; Donlan & Costerton, 2002).

6- Área da Coleta de Microrganismos

Limitada ao norte, pela rodovia BR-93 e área urbana do Município de Magé; ao sul, pela Serra de Itaúna e Ilha de Itaoca; a leste pela rodovia BR-493 e ramal ferroviário de Itambi-Campos, e, a oeste, pela Baía de Guanabara, a APA de Guapimirim abrange os manguezais da orla oriental da Baía de Guanabara, nos municípios de Magé, Guapimirim, Itaboraí e São Gonçalo, possui cerca de 140 km², perfazendo uma área de 14.340 ha. Foi criada pelo Decreto Federal número 90.225 de 25 de setembro de 1984, e atualmente é administrada pelo IBAMA (<http://www.guapimirim.com.br/protecao/protec.htm>).

Segundo a resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente - CONAMA No. 10/88), unidades de conservação denominadas Área de Proteção Ambiental (APA) foram criadas e destinadas a proteger e conservar os sistemas naturais ali presentes, visando melhoria de qualidade de vida da população local e também objetivando a proteção dos ecossistemas regionais, sempre com um

zoneamento ecológico-econômico estabelecendo normas de uso, respeitando as condições do local, sejam elas bióticas, geológicas, urbanísticas, agropecuárias, extrativistas e culturais do local, entre outras (<http://www.guapimirim.com.br/protecao/protec.htm>).

Cada APA possui normas estabelecidas pelo Poder Executivo, limitando ou proibindo a implantação e funcionamento de indústrias potencialmente poluidoras, capazes de afetar mananciais de água, a realização de obras de terraplanagem e a abertura de canais, o exercício de atividades capazes de provocar acelerada erosão das terras e/ou um acentuado assoreamento das condições hídricas e o exercício de atividades que ameacem extinguir, na área protegida, as espécies (Lei No. 6902 de 27/04/1981).

A APA de Guapimirim é cortada por diversos rios e canais: Suruí, Irirí, Magé, Guapimirim, Roncador, Guapi, Caceribu, Guaraí, Macacu, Guaximdiba. Os rios que banham os manguezais são típicos por formarem curvas sinuosas, onde as águas vão perdendo velocidade e depositando sedimento que trazem da terra firme. Os canais de seus leitos adentram cerca de um quilômetro na Baía de Guanabara (Botelho, 2003).

Em março de 1997, um rompimento de duto da Reduc provocou um vazamento de 600 mil litros de petróleo, alcançando 4.000 m² de manguezal. Novamente em janeiro de 2000, houve um vazamento de 1.292 milhões de litros de óleo da Petrobrás, e, em junho, mais 380 litros de petróleo atingiram a Baía de

Guanabara. Após a vistoria realizada em 22 de fevereiro de 2000 na APA de Guapimirim e seu entorno, foi emitido um laudo técnico pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), segundo o qual revelou que o óleo causou forte impacto na área de manguezal do rio Suruí, enquanto que cerca de 10% da área total da APA foi atingida pelo derrame (Botelho, 2003).

Estudos verificaram o impacto do óleo derramado nesta região. O mapa da Baía de Guanabara (Fig. 6) mostra em vermelho, as regiões atingidas pelo óleo, definidas em março de 2000, após a avaliação visual dos efeitos do acidente por profissionais de universidades e outros órgãos. De uma forma geral, o manguezal da APA de Guapimirim apresentou apenas pequenas porções de óleo na borda do manguezal em Itaoca, porém se mostrou extremamente impactado em Magé (no entorno da foz do rio Suruí). No rio Suruí foi encontrada maior concentração de óleo em seu corpo d'água, sendo insignificante a quantidade no restante da bacia. Os únicos pontos contaminados detectados foram os do rio Guaxindiba e no riacho entre este e o rio Itaoca, devido a grande carga de efluentes domésticos que neles são despejados. As demais estações apresentam níveis baixos de hidrocarbonetos devido em grande parte às suas localizações no ecossistema, quase todas dispostas à borda do mangue sujeitas tanto à invasão periódica da maré quanto às demais características necessárias à degradação do óleo (Botelho, 2003).

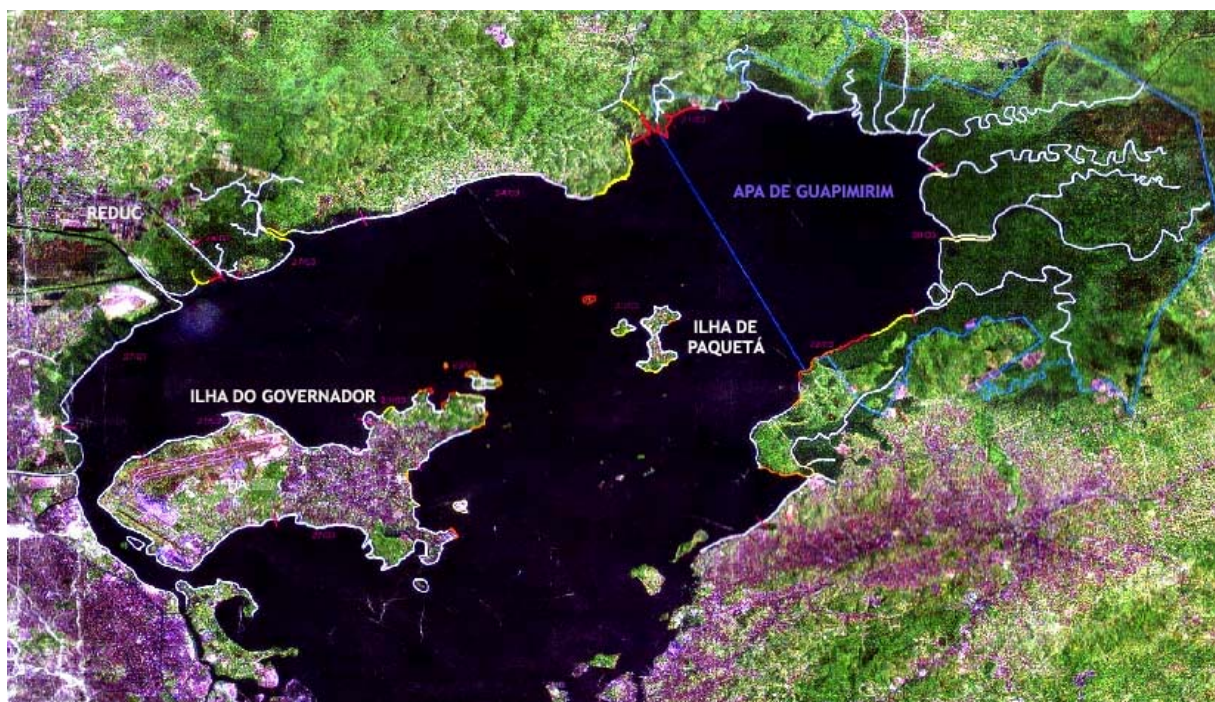


Fig. 6 – Mapa da Baía de Guanabara, mostrando, em vermelho, as áreas atingidas pelo derramamento de petróleo de 2000 (LANDSAT).

Por ser uma área com importância comercial e recreativa, seja pela pesca, pelas praias, pela navegação recreativa, pelo turismo e outros usos, este derramamento causou um impacto sócio-econômico significativo, uma vez que houve redução da pesca e recreação na região, sendo importante tomar medidas rápidas para limpeza eficaz da região (Michel, 2000).

Tendo em vista a utilização de técnicas para a rápida e eficiente limpeza, sem causar maiores danos à biota envolvida, propusemos este trabalho de produção de surfactante por bactérias marinhas hidrocarbonoclásticas isoladas de mangue.

OBJETIVOS

Objetivos Específicos

- Isolar consórcios bacterianos hidrocarbonoclásticos de sedimento superficial de mangue impactado por petróleo;
- Selecionar consórcios bacterianos hidrocarbonoclásticos produtores de surfactante;
- Manter os consórcios bacterianos hidrocarbonoclásticas em estado em meio de cultura, no laboratório;
- Caracterizar os consórcios bacterianos;
- Verificar a capacidade de produção de biofilme pelos consórcios;
- Padronizar a metodologia para determinar a biomassa surfactante;
- Analisar a eficiência do biosurfactante;
- Estudar condições para produção do biosurfactante;
- Determinar a curva de crescimento dos consórcios e acompanhar a emulsificação de hidrocarbonetos ao longo do tempo.

MATERI AL E MÉTODOS

1- I solamento de consórcio de bactérias hidrocarbonoclásticas

1.1- Coleta de sedimento

Os consórcios bacterianos utilizados nos ensaios foram isolados a partir de amostras de sedimento superficial do mangue da APA de Guapimirim previamente contaminado com petróleo, localizado a 22°40'-22°46' S e 42°57'-43°07' W (Fig. 7). As amostras de sedimento foram armazenadas em caixa termo-estável e transportadas para o Laboratório de Microbiologia Marinha da UFF.



Fig. 7 - Mangue de Guapimirim, São Gonçalo, RJ.

1.2- Coleta da água do mar

A água do mar para preparo dos meios de cultura foi coletada na Praia de Itacoatiara (-22°54'; -43°12'), Niterói, RJ (Fig. 8). Esta foi filtrada em membrana

com poro de 0,45 μm para retirada de material particulado, esterilizada (120°C por 30 min) e diluída em água deionizada conforme a necessidade do ensaio.



Fig. 8 - Praia de Itacoatiara, Niterói, RJ.

1.3- Seleção de consórcios de bactérias hidrocarbonoclásticas

Após a coleta, o sedimento foi colocado em meio de cultura com 75% de água do mar e com $0,1 \text{ ml L}^{-1}$ de Árabe Leve, 10g L^{-1} de sacarose e 1g L^{-1} de uréia e recebeu choque térmico por 20 minutos a 80°C . Os frascos com o meio de cultura e sedimento foram incubados por 30 dias à temperatura ambiente para selecionar e aumentar a biomassa bacteriana.

2- Triagem de consórcios hidrocarbonoclásticos potencialmente produtores de biossurfactante

2.1-Semeadura em meio sólido para separação das bactérias dos consórcios

Para caracterização e isolamento dos consórcios produtores de biossurfactante, os crescidos no item 1.3 foram plaqueados em Agar Congo (com composição idêntica ao meio líquido descrito no item anterior, exceto Árabe Leve), acrescido de 20g L⁻¹ de Agar-agar e 0,8% de vermelho congo. Após 21 dias de incubação, a morfologia, a coloração e a textura das colônias foram observadas. As colônias mucóides, com coloração avermelhada foram selecionadas para os próximos testes.

2.2– Verificação da produção de biofilme e teste do colapso da gota

As colônias bacterianas selecionadas foram inoculados em tubos de vidro com 5 mL de meio de cultura contendo 2g L⁻¹ de bactopectona, 10g L⁻¹ de sacarose e 75% de água do mar e incubados por 98 horas.

A verificação da produção de biofilme foi determinada pela observação de crescimento bacteriano nas paredes internas do tubo. Para observar a capacidade de produção de biossurfactante, 5 mL de cada um dos tubos foram retirados e colocados em placas de Petri juntamente de 0,1 mL de Árabe Leve. Havendo a formação de gotículas de Árabe Leve no meio de cultura (emulsão), o consórcio foi considerado como produtor de biossurfactante. Os consórcios com maior

biomassa, determinada visualmente pela turbidez do meio de cultura, aderência às paredes internas do tubo e com capacidade para dispersar o óleo foram selecionados e bioamplificados para os ensaios a seguir.

3- Amplificação e manutenção dos consórcios bacterianos potencialmente produtores de biosurfactantes

Os consórcios produtores de biofilme com atividade emulsificante foram inoculados primeiramente em tubos de vidro com 10 mL de meio de cultura e incubados por 15 dias a 37°C. Após este período, duas alíquotas de 5 mL para cada uma das amostras crescidas em tubo, foram transferidas para 50 mL de meio de cultura com 2 gL⁻¹ de bactopectona, água do mar a 75% e 10 gL⁻¹ de sacarose ou 0,1 mL de Árabe Leve para aumento da biomassa. Estes foram mantidos a 37°C até o momento dos ensaios, dando origem a dois grupos de amostras, as mantidas em Árabe Leve (AL1, AL2 e AL3) e em sacarose (S1, S2 e S3).

4- Caracterização dos consórcios

4.1- Teste de esporulação

Para caracterizar os consórcios, foi realizado o teste de esporulação, em que 1 mL dos consórcios AL1, AL2 e AL3 foram colocados em água do mar ou água deionizada estéril e incubada por 30 dias. Após este período, alíquotas de

0,2 mL foram retiradas e a presença de esporos em cada uma das soluções foram observadas a fresco no microscópio Axioskop modelo 50 da Zeiss, com aumento de 1000 vezes.

4.2- Características nutricionais

A caracterização nutricional utilizando substratos, dependentes de transportadores de membrana, foi realizada incubando em triplicata 0,5 mL dos consórcios AL1, AL2, AL3, S1, S2 e S3, em 5 mL de meio de cultura com $0,5\text{gL}^{-1}$ de uréia, 50% da água do mar diluída em água deionizada e $0,5\text{gL}^{-1}$ da fonte de carbono, podendo ser Galactose (GAL), Lactose (LAC), Glicose (GLI), Oxalato de amônio (OXA), Citrato de sódio (CIT), Ácido benzóico (AB) e Ácido Aspártico (ASP). As amostras foram incubadas em triplicata para cada composto e os resultados de 6, 15, 30 e 60 dias foram anotados de acordo com o crescimento em cada uma das réplicas de cada composto. Atribuindo (+) para crescimento positivo em pelo menos 2 tubos e (-) na ausência de crescimento em pelo menos 2 tubos.

5- Ensaios preliminares para determinação da biomassa surfactante

5.1- Quantificação bacteriana em 5 dias

Para a caracterização mais precisa dos consórcios, seu comportamento na presença de Árabe Leve e padronização do ensaio, alíquotas de 5 mL dos consórcios bioamplificados AL1, AL2, AL3, S1, S2 e S3 foram inoculadas em 50 mL de meio de cultura contendo 1gL^{-1} de sacarose, $0,5\text{gL}^{-1}$ de uréia e 75% de água do mar diluída em água deionizada. A incubação foi feita durante 5 dias a 37°C , com leitura a cada 24 horas. A cada dia, foi retirada uma alíquota para a quantificação do carbono bacteriano e número de endósporos. Todos os consórcios foram corados com vermelho de acridina, contados em microscopia de epifluorescência (item 5.1.1) e o Carbono Bacteriano (CB) foi calculado conforme descrito no item 5.1.2. A taxa de emulsificação foi realizada apenas na leitura de 5 dias. Uma alíquota de 5 mL da amostra foi retirada e depositada em um tubo de vidro com tampa rosqueada. Após a adição de 0,1 mL de Árabe Leve, cada tubo foi agitado por 1 minuto em vortex e deixados em repouso por 2 horas até a leitura da altura da emulsificação presente na interface óleo-meio de cultura. A Taxa de Emulsificação (TE) foi determinada segundo a fórmula (Paraszkiewicz *et al.*, 2002):

$$\text{TE} = (\text{HE} / \text{HT}) 100$$

Onde:

TE = taxa de emulsificação

HE = altura total da camada de emulsão

HT = altura total do meio de cultura com o hidrocarboneto

5.1.1- Quantificação das células bacterianas por epifluorescência

A solução foi diluída 1:40 em água deionizada estéril a um volume de 1,95 mL e corada com 75µL de vermelho de acridina e filtrada em membrana Nuclepore de policarbonato preta com 0,22 µm de porosidade e diâmetro de 25 mm. As bactérias foram contadas em 10 campos, em triplicata, com auxílio do microscópio Axioskop modelo 50 da Zeiss e aumento de 1000 vezes. O número de bactérias para cada consórcio foi calculado segundo Kepner *et al.* (1994):

$$\text{Número de células} \cdot \text{cm}^{-3} = X A d a^{-1} n^{-1} V^{-1}$$

Onde:

X = média do somatório de células contadas (somatório dos campos contados)

A = área do filtro de policarbonato [$\pi r^2 = 3,14 (1,25)^2 = 4,90625 \text{ cm}^2$]

d = diluição

a^{-1} = área do campo do microscópio [$1/\pi r^2 = 1/3,14 (0,0090)^2 = 3931,745 \text{ cm}^2$]

n^{-1} = número de campos contados

V^{-1} = volume da amostra filtrada

5.1.2- Determinação do carbono bacteriano (CB)

O carbono bacteriano foi calculado através do método de Carlucci *et al.* (1986). Os autores propuseram uma fórmula para quantificar o carbono bacteriano usando o fator $CB = X \cdot 1,2 \cdot 10^{-14}$ correspondendo a $\mu\text{g C cm}^{-3}$; onde $X = \text{número de células} \cdot \text{cm}^{-3}$.

5.2- Acompanhamento da biomassa e produção de surfactante por 15 dias

Para o acompanhamento semanal da biomassa e da produção de surfactante, apenas os consórcios AL1, AL2 e AL3 foram utilizados no ensaio. Estes foram inoculados em 50 mL de meio de cultura contendo 50% de água do mar diluído em água deionizada, 1 gL^{-1} de sacarose e $0,5 \text{ gL}^{-1}$ de uréia, incubados por 15 dias a 37°C . A quantificação da TE dessas bactérias em querosene (Rend Plast, Petrobrás), gasolina C comum automotiva (Posto Petrobrás King Kong, Niterói, RJ), constituída de gasolina A e 22% de álcool etílico anidro, com máximo de benzeno de 1,0%vol. e de 57% de hidrocarbonetos aromáticos e querosene de iluminação (Nunes & Bonomi, 2002) e Árabe Leve (Petrobrás) foi realizada em triplicata, com acompanhamento em 6 e 15 dias de incubação.

Antes da adição dos derivados do petróleo, uma alíquota foi retirada para contagem do CB nos dias 0, 6 e 15 conforme explicado nos itens 5.1.1 e 5.1.2. Após a contagem, 6 mL dos compostos foram colocados separadamente em 4mL de meio de cultura, agitados em vortex por 1 minuto. Após 24 horas, a leitura dos tubos foi realizada, levando em conta a TE, assim como a emulsificação nas fases aquosa (B) e não aquosa (A). Cada um desses valores foi calculado baseado nas fórmulas abaixo:

$$TE = (HE / HT) 100$$

Onde:

TE = taxa de emulsificação total após 24 horas de repouso

HE = altura total da camada de emulsão

HT = altura total do meio de cultura com o hidrocarboneto

$$A = (HA / HC) 100$$

Onde:

A = taxa de emulsificação da fase não aquosa após 24 horas de repouso

HA = altura da emulsão não aquosa

HC = altura total do composto

$$B = (HB/ HM) 100$$

Onde:

B= taxa de emulsificação da fase aquosa após 24 horas de repouso

HB= altura da emulsão aquosa

HM = altura total do meio de cultura

6- Estudo das condições para produção de biossurfactantes

6.1- Salinidade

O primeiro passo foi verificar a influência da salinidade no crescimento e na produção de surfactante. Para isso, foram preparados meios de cultura sem água do mar e com 25% ou 50% de água do mar diluída em água deionizada, assim como 10gL⁻¹ de sacarose e 2gL⁻¹ de bactopectona. Dez mililitros deste meio foram distribuídos em tubos de vidro com tampa rosqueada, nos quais 1 mL dos consórcios AL1, AL2, AL3, S1, S2 e S3 foram inoculados em duplicata. Em um dos tubos, foi acrescentado 0,1 mL de Árabe Leve e então, incubados a 37°C por 30 dias. As amostras com melhores resultados, maior biomassa e de aspecto mucóide foram transferidas para 50 mL do mesmo meio, a fim de amplificar a biomassa e continuar o acompanhamento por mais 30 dias. A

concentração de água do mar que propiciou melhor crescimento e produção de surfactante passou a ser utilizada nos ensaios de taxa de emulsificação.

6.2- Tempo de incubação

Visando adaptar os consórcios às novas condições do meio de cultura (T_0), 10 mL dos consórcios AL1, AL 2 e AL3 foram inoculados em 100mL do meio de cultura descrito no item 5.2, distribuídos em frasco Wheaton com base achatada e incubados por 15 dias a 37°C. Para acompanhar o tempo necessário para a produção de surfactante, após este período, 5 mL do T_0 foram transferidos para novo meio de cultura e incubados por até 70 dias. A cada 3 dias, incluindo o T_0 , foram retiradas alíquotas para contagem do CB (item 5.1.1 e 5.1.2) e a TE, A e B foram quantificados seguindo o item 5.2. A Tensão de Superfície (TS) de cada um dos consórcios foi medida em 15 dias (item 7).

6.3- Tipo de frasco e oxigenação

O ensaio anterior suscitou perguntas que buscamos responder modificando as condições de cultivo. Sendo assim, seguindo o procedimento dos itens 5.2 e 6.2, foram utilizados dois tipos de frascos de vidro com tampa esmerilhada: frascos Wheaton (250 mL) com superfície interna irregular, base convexa e com maior área para oxigenação e superfície de adesão e Erlenmeyers (250 mL),

frascos com superfície interna lisa, cônicos e com menor área para oxigenação e substrato de adesão que os anteriores (Fig. 9). Após inoculação das amostras, foi adicionado cuidadosamente óleo mineral aos frascos, o suficiente para cobrir a superfície do meio de cultura evitando as trocas gasosas do líquido com o ar. Foram feitos frascos controle, sem adição de óleo mineral. Foram realizadas leituras com 0, 6, 15, 18 e 30 dias para a contagem do CB (item 5.1.1 e 5.1.2) e medidas da TE, A e B (item 5.2).



Fig 9- Frascos utilizados para os ensaios: à esquerda Erlenmeyer e à direita Wheaton.

7- Análise da eficiência do biossurfactante

Foram utilizadas amostras com 15 dias de crescimento em meio de cultura contendo 25% de água do mar diluída em água deionizada, 2 gL⁻¹ de uréia e 15 gL⁻¹ de sacarose e do item 6.2 distribuídos em Erlenmeyers de 250 mL com

tampa de vidro esmerilhada. Uma alíquota de 80 mL do crescimento de 15 dias nos meios foram utilizadas para determinar a densidade e a tensão superficial a 27°C, a fim de comparar o melhor meio de cultura para produção de surfactante. A densidade foi medida pelo método do tubo vibrante com o aparelho DMA modelo 4500 da Anton Paar. A tensão de superfície (TS) foi medida pelo método do anel utilizando o tensiômetro K12 da Krüss, com auxílio do Professor Luiz Sérgio Radino Lamego (Laboratório de Físico-química, Instituto de Físico-Química, Universidade Federal Fluminense). A água destilada e o meio de cultura foram utilizados como controle em todas as medidas.

8- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A formação de biofilme foi observada inoculando os consórcios AL1, 2 e 3 em tubos contendo meio de cultura (descrito no item 7) e lamínulas de vidro com 0,25 cm² de área e incubados por 15 dias a 37°C. As lamínulas foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão de cacodilato de sódio por 2 horas à temperatura ambiente, pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% diluído em tampão cacodilato por 40 minutos, preparadas para o ponto crítico desidratando com etanol a 30%, 50%, 70%, 90% e 100% e cobertas com ouro. A visualização foi realizada no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) modelo da Zeiss com o Professor Ulisses Casado Lins (Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho).

9- Análise estatística dos dados

Os valores de TE ao longo do tempo de cada amostra para cada composto utilizado; o aumento do carbono bacteriano de cada consórcio ao longo do tempo; as emulsificações (A) e (B) de cada amostra em um dado tempo de incubação para cada um dos compostos; o tipo de emulsificação prevalente (A ou B) para cada um dos dois tipos frascos, para cada uma das 3 amostras e compostos e o valores de TS foram analisados pelo teste t-Student.

As TE de cada composto e o carbono bacteriano ($\mu\text{g C.cm}^{-3}$) foram correlacionados através do programa STATISTICA for Windows (StatSoft, Inc., 2000). Somente foram considerados resultados com $p < 0,05$.

RESULTADOS

1- Isolamento de consórcios de bactérias hidrocarbonoclásticas

Em janeiro de 2000, a APA de Guapimirim, assim como outras áreas da Baía de Guanabara, sofreram impacto por petróleo equivalente a 300.000 galões de óleo, com densidades diferentes (Michel, 2000). Dois anos após este impacto, foram coletadas amostras de sedimento superficial de mangue contaminado com óleo, sendo possível isolar consórcios bacterianos hidrocarbonoclásticos.

2- Triagem de consórcios potencialmente produtores de biosurfactante

A semeadura em Agar Congo permitiu distinguir colônias rosa-avermelhadas de brancas (Fig. 10). Com isso, foram selecionadas 3 colônias mucóides, de coloração rosa-avermelhada e com bordas bem definidas, diferenciando uma da outra pelo tamanho das colônias. Dos consórcios 1 e 3 foram selecionados colônias grandes com aproximadamente 3 mm de diâmetro, enquanto do consórcio 2 foram retiradas colônias pequenas de aproximadamente 1 mm.

A verificação da produção de biofilme e o teste do colapso da gota mostraram que estes consórcios eram capazes de crescimento aderido nas

paredes internas do tubo e produção de microemulsões na interface óleo-água quando foi adicionado o Árabe Leve.



Fig. 10 – Placa de Petri contendo Agar Congo para ilustrar a coloração rosa-avermelhada das colônias do consórcio 1 (escala 1 cm).

3- Amplificação e manutenção dos consórcios potencialmente produtores de biossurfactante

As 3 colônias aprovadas pelos testes de produção de biofilme e colapso da gota, foram separadas em dois grupos (AL ou S) com diferentes fontes de carbono fornecidas, para verificar diferenças no crescimento, metabolismo ou intensidade da produção de surfactantes. Aos consórcios AL1, AL2 e AL3 foram disponibilizados Árabe Leve em meio de cultura líquido, enquanto aos

consórcios S1, S2 e S3 a sacarose foi oferecida. Nos dois meios de cultura foi observado crescimento bacteriano considerável, não mostrando à primeira vista diferenças consideráveis entre os meios de manutenção.

4- Caracterização dos consórcios

4.1- Teste de esporulação

A observação a fresco dos consórcios AL1, AL2, AL3, S1, S2 e S3 em microscopia óptica revelou a presença de endósporos nas amostras analisadas.

4.2- Características nutricionais

Todos os consórcios AL1, AL2, AL3 e S1, S2, S3 cresceram na presença de GAL, LAC, GLI, CIT, AB e ASP em 6 dias de incubação, com exceção do consórcio AL2, que não cresceu na presença de AB. Somente com 15 dias de incubação os consórcios cresceram em OXA. Como apresentado na Tabela 1 dos 30 aos 60 dias de incubação foi observado destaque no crescimento em compostos como GLI (exceto para AL1 e S1) e CIT (exceção do S2).

Tabela 1 – Diversidade nutricional de consórcios em 30 e 60 dias de incubação em variadas fontes de carbono.

Consórcios	Fonte de Carbono						
	GAL	LAC	GLI	OXA	CIT	AB	ASP
AL1	+	+	-	-	+	-	-
AL2	-	-	+	-	+	-	-
AL3	-	+	+	+	+	+	+
S1	+	-	-	-	+	-	-
S2	+	-	+	+	-	-	-
S3	-	-	+	-	+	-	-

AL: Consórcios mantidos em Ára-be Leve; S: Consórcios mantidos em sacarose. *Ensaio realizado em triplicata; (+) Crescimento em pelo menos 2 tubos; (-) Sem crescimento em pelo menos 2 tubos; (GAL) Galactose; (LAC) Lactose; (GLI) Glicose; (OXA) Oxalato de amônio; (CIT) Citrato de sódio, (AB) Ácido benzóico e (ASP) Ácido Aspártico. Resultados mantidos na leitura de 60 dias.

Graças ao AL3 que cresceu bem em todos os compostos testados, os consórcios mantidos em Ára-be Leve apresentaram uma maior versatilidade na utilização de diversas fontes de carbono (26% dos tubos com crescimento), enquanto apenas 16% dos tubos contendo diferentes fontes de carbono apresentaram crescimento dos consórcios mantido em sacarose.

5- Ensaio preliminar para determinar a biomassa surfactante

5.1- Quantificação bacteriana em 5 dias

A quantificação bacteriana mostrou redução do número de endósporos ao longo dos 5 dias de incubação (Fig. 11) para todos os consórcios. O AL1 e AL3 que tiveram o maior número de endósporos da ordem de 10^8 endósporos.cm⁻³ no T₀ (Anexo I, Tabela 1), apresentaram aumento do CB em 5 dias (0,84-2,78 e

0,68-1,17 $\mu\text{gC cm}^{-3}$, respectivamente; Anexo I, Tabela 2) ($p < 0,05$). O S1 e S3 apresentaram redução do CB neste mesmo período ($p < 0,05$), como representado na Fig. 12.

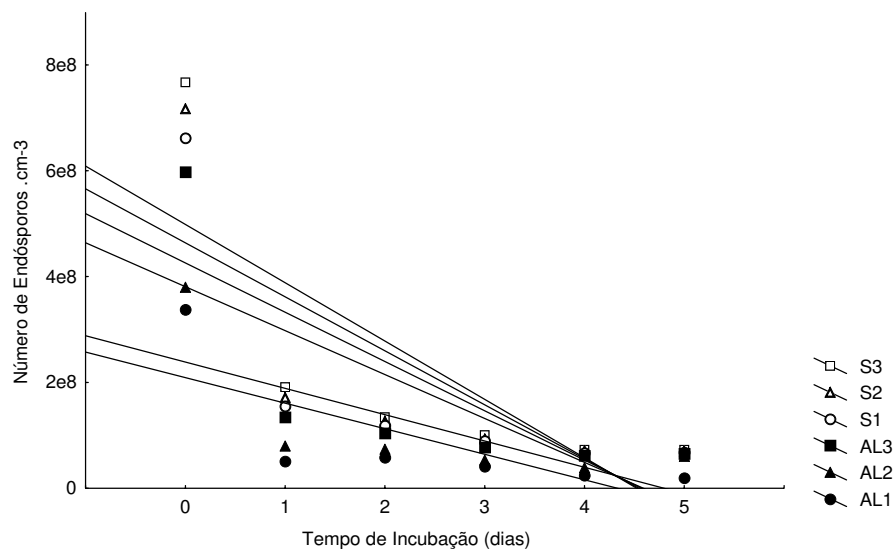


Fig. 11 – Número de endósporos dos consórcios produtores de surfactante ao longo de 5 dias ($p < 0,05$).

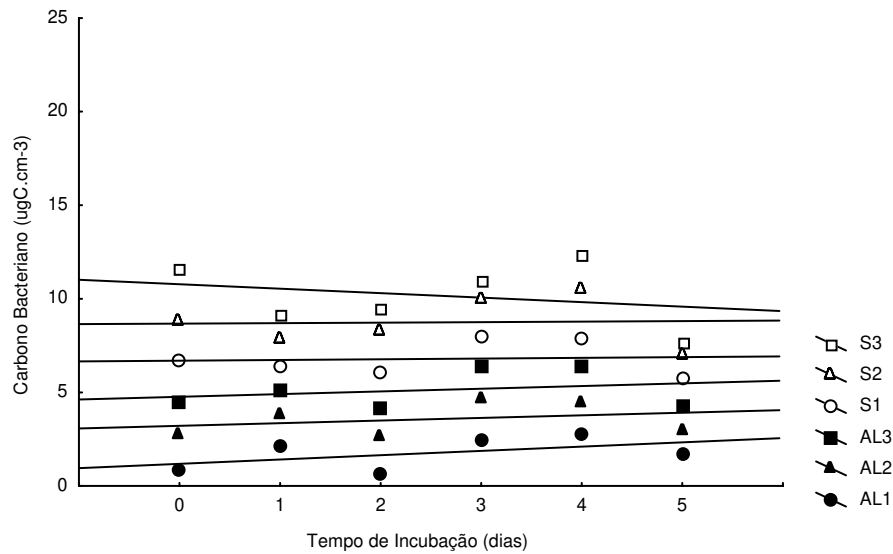


Fig. 12 – Carbono bacteriano ($\mu\text{g C.cm}^{-3}$) dos consórcios produtores de surfactante ao longo de 5 dias ($p < 0,05$).

Todos os consórcios apresentaram emulsificação no dia 5, cada um com uma intensidade diferente: AL1 4,12%; AL2 3,29%; AL3 2,78%; S1 3,81%; S2 3,25% e S3 2,37%. O AL1 apresentou maior TE (4,1%) e CB (Anexo I, Tabela 2) neste mesmo período ($p < 0,05$), indicando uma relação da densidade populacional com a produção de surfactante.

5.2- Acompanhamento da biomassa e produção de biosurfactante por 15 dias

Em todos os consórcios, com 6 dias de incubação, foram observadas a emulsificação da gasolina, porém para os consórcios AL2, AL3 e S1 a TE foi

maior no T15 ($p < 0,05$) (Anexo I; Tabela 3). Houve aumento da emulsão do querosene e do Árabe Leve nos consórcios AL1, AL2, AL3, S1 e S3 no dia 15 ($p < 0,05$), sendo que o AL1 apresentou aumento da TE com $p < 0,05$ apenas para o querosene (Anexo I, Tabela 3).

Todas as amostras apresentaram emulsificação tanto na fase não aquosa (A) quanto na aquosa (B) para a gasolina, independente do tempo de incubação (Anexo I; Tabela 4 e 5). Houve aumento da emulsificação A e B da gasolina em 15 dias de incubação para o AL2 e AL1, respectivamente ($p < 0,05$). Os consórcios AL2 e S3 apresentaram maior emulsificação A para o querosene e gasolina, respectivamente, no dia 6 ($p > 0,05$) (Anexo I, Tabela 5). Diferindo da gasolina e querosene, a emulsificação do Árabe Leve pelo AL1, AL3 e S2 no dia 15 foi maior na fase B ($p < 0,05$), mostrando a predominância da emulsificação aquosa (B) para este composto.

O CB aumentou no dia 15 de incubação ($p < 0,05$), para todos os consórcios com exceção do S1 (Fig. 13). Os maiores valores de CB ($p < 0,05$) foram apresentados por AL1, AL2, S2 e S3 (Anexo I; Tabela 6).

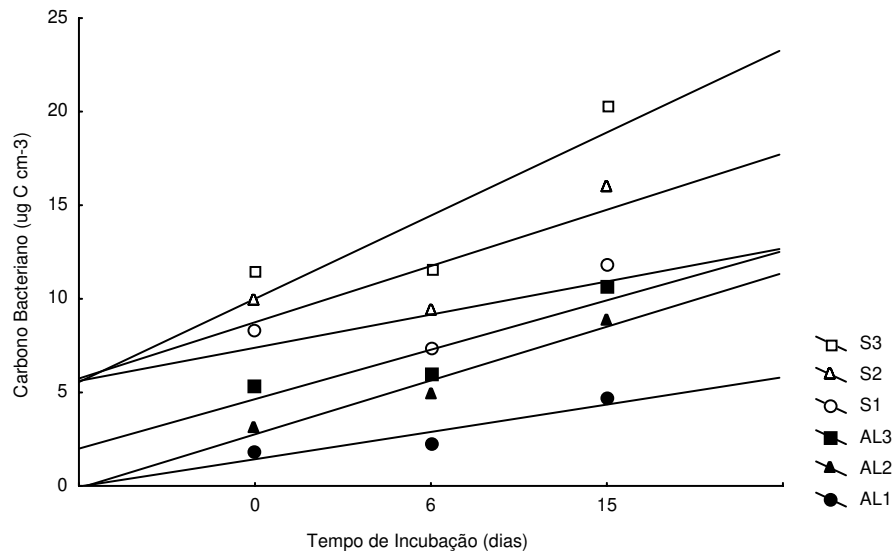


Fig. 13– Carbono bacteriano ($\mu\text{g C.cm}^{-3}$) dos consórcios produtores de surfactante com 0, 6 e 15 dias de incubação ($p < 0,05$).

6- Estudo das condições para produção de biosurfactantes

6.1- Salinidade

Todos os consórcios (AL1, AL2, AL3, S1, S2 e S3) cresceram em meio de cultura com 25% e 50% de água do mar, mas não cresceram sem a água do mar. No meio de cultura contendo 25% de água do mar, todos (com exceção do AL3 e S3) apresentaram crescimento intenso, sem a produção do muco observada nas amostras com meio de cultura com 50% de água do mar. Sendo assim, para os ensaios de tempo de incubação e tipo de frasco o meio de cultura foi preparado com 50% de água do mar, enquanto para os ensaios de concentração da fonte de carbono foram utilizados meio de cultura com 25% de água do mar.

6.2- Tempo de incubação

Todos os consórcios apresentaram a emulsificação do querosene, gasolina e Árabe Leve de 0 a 70 dias, como demonstrado nas Tabelas 7, 9 e 11 do Anexo II a. Para ilustração, no Anexo IV estão inseridas algumas fotos (Fig. 44) da taxa de emulsificação do querosene, gasolina e do Árabe Leve antes e após agitação em vortex.

Apenas o AL2 apresentou aumento da TE do querosene ao longo dos 70 dias ($p < 0,05$). Os outros consórcios apresentaram aumento da TE deste composto do 3° até o 70° dia para o AL1 e até o 24° dia para o AL3 (Tabela 7, Anexo II a). A TE da gasolina aumentou ao longo dos 70 dias de incubação para o AL1 e AL2 (Tabela 9, Anexo II a). Para o Árabe Leve, o aumento da TE se deu de 0 a 24 dias para o AL3 e de 6 a 24 dias para o AL2 ($p < 0,05$) (Tabela 11, Anexo II a).

Os maiores valores de TE do querosene foram encontrados em 9, 15, 24, 27 e 70 dias para o AL1; em 15 dias para o AL2 e em 9, 15, 21 e 24 para o AL3. Da gasolina foram encontrados em 9, 15, 18, 24, 27 e 70 dias de incubação para o AL1 e 18 e 70 dias para o AL2. Do Árabe Leve foram em 18 e 27 dias para o AL1; em 6, 12, 24 e 27 para o AL2 e em 15, 18 e 24 para o AL3 ($p < 0,05$).

Como apresentado nas tabelas 7, 9 e 11 do Anexo II a, o carbono bacteriano reduziu ao longo dos 70 dias de incubação em todos os consórcios ($p < 0,05$), porém houve formação de biofilme na base do frasco.

Quando TE foi correlacionada com CB, apenas o AL3 apresentou correlação negativa para o querosene em 15 dias e para o Árabe Leve em 18 dias, como apresentados nas Fig. 14 e 15.

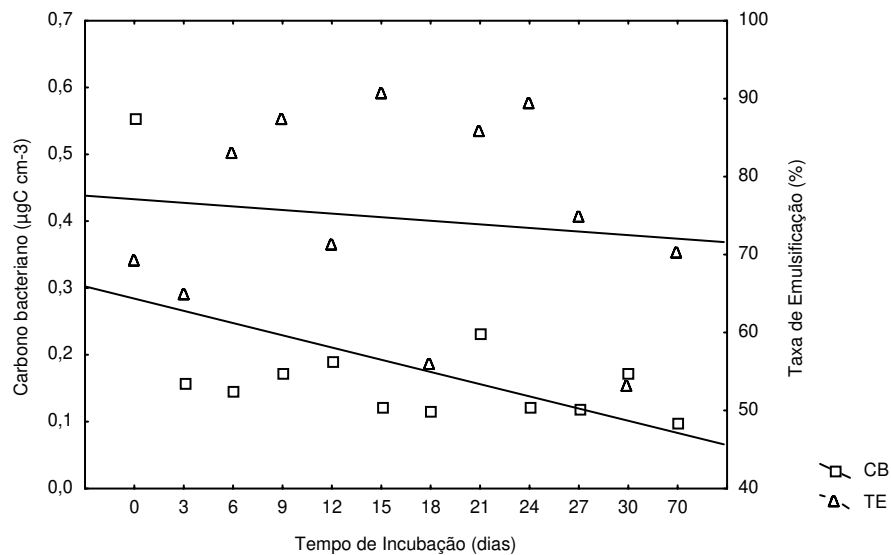


Fig. 14– Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 3 ao longo de 30 dias (T 15; $r=-1,0$; $p<0,05$).

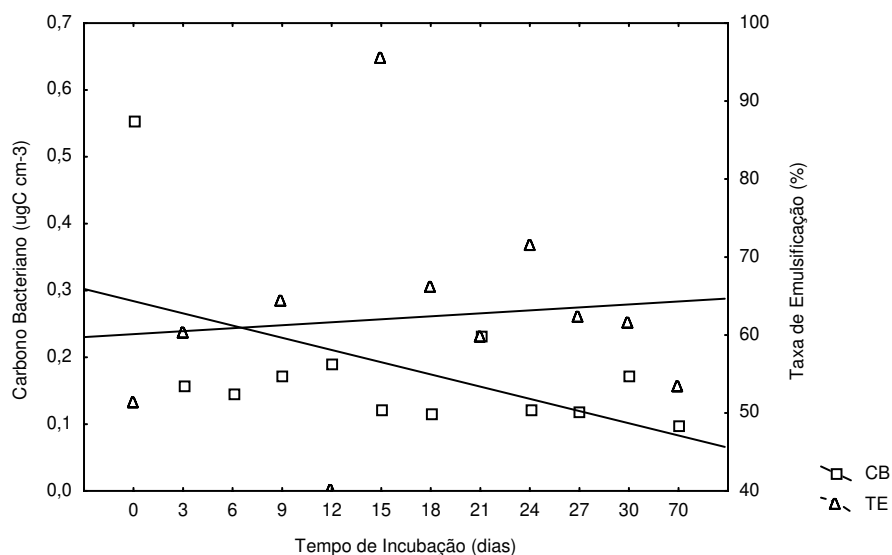


Fig. 15 – Taxa de emulsificação (TE%) do Árabe Leve e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do consórcio AL 3 ao longo de 30 dias (T18; $r=-1,0$; $p<0,05$).

Nas Tabelas 8, 10 e 11 do Anexo II estão descritos os valores da emulsificação A e B do querosene, gasolina e Árabe Leve. AL1 e AL3 apresentaram aumento da emulsificação A do querosene até 70 dias e AL2, até 24 dias. A emulsificação A da gasolina aumentou em 70 dias para o AL2 e AL3 e em 30 dias para o AL1. Já a emulsificação A do Árabe Leve aumentou até 18 dias para o AL1 e até 27 e 30 dias para o AL2 e AL3, respectivamente ($p<0,05$).

Os maiores valores da emulsificação A do querosene foram no dia 24 para o AL1; nos dias 9, 15, 18, 21 e 27 para o AL2 e nos dias 9, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 para o AL3; para a gasolina nos dias 6, 9, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 para o AL1, nos dias 18 e 70 para o AL2 e 6, 12, 18, 24 e 70 para o AL3. Os maiores valores

da emulsificação A do Árabe Leve foram em 18 dias para o AL1, em 27 dias para o AL2 e 12 e 15 dias para o AL3 ($p < 0,05$).

Da mesma forma ocorrida para a emulsificação A, houve aumento da emulsificação B do querosene até 70 dias para o AL1 e AL3, diferenciando do AL2, que apresentou aumento do B até 27 dias. Para a gasolina, houve aumento da emulsificação B ao longo dos 70 dias de incubação para AL1 e AL2, enquanto para o AL3 o aumento foi até 15 dias ($p < 0,05$). Não foi possível detectar aumento da emulsificação B ao longo do tempo para o Árabe Leve. O AL3 apresentou redução da emulsificação B a partir do dia 9 em diante (de 93,99% para 60,00%; $p < 0,05$).

Quanto à preferência da emulsificação de cada composto ao longo do tempo, segundo o teste T, o Árabe Leve foi emulsificado principalmente na fase (B) independente do tempo ou do consórcio, enquanto o querosene e a gasolina apresentaram a emulsificação (A), como representado na Tabela 2 ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Representação da preferência de emulsificação aquosa (B) ou não aquosa (A) do querosene, gasolina e Árabe Leve ao longo do tempo para os consórcios produtores de surfactante.

Amostras	Tempo de incubação (dias)																					
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	70										
AL1	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
AL2	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
AL3	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B

AL: Consórcios mantidos em Árabe Leve. A cor determina o composto emulsificado: azul – querosene, amarelo – gasolina e vermelho - Árabe Leve segundo o teste T. Somente foram representadas diferenças com $p < 0,05$.

6.3- Tipo de frasco e oxigenação

Datas de incubação utilizadas determinadas pelo ensaio de Tempo de Incubação e os resultados estão apresentados no Anexo II b.

Pelo teste T, os controles em Erlenmeyers AL1 e AL2 apresentaram maior TE do Árabe Leve no dia 18 que nos frascos com óleo mineral ($p < 0,05$). Entretanto em Wheaton, todos os consórcios apresentaram maior TE do Árabe Leve ou querosene, quando incubados com óleo mineral (Tabela 3). Para a gasolina não houve diferença significativa entre os controles ou com óleo mineral seja em frascos Erlenmeyer ou em Wheaton.

Tabela 3 – Comparação dos valores de TE dos consórcios controle (c) e com óleo mineral (o) incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias em frascos Wheaton analisados pelo teste T ($p < 0,05$).

Consórcios	Tempo de Incubação									
	0		6		15		18		30	
AL1	c	o	c	o	c	o	c	o	c	o
AL2	c	o	c	o	c	o	c	o	c	o
AL3	c	o	c	o	c	o	c	o	c	o

AL: Consórcios mantidos em Árabe Leve. A cor determina o composto emulsificado: azul – querosene, amarelo – gasolina e vermelho - Árabe Leve; e a letra (c) TE maior no controle e (o) TE maior no óleo mineral segundo o teste T. Somente foram representadas diferenças com $p < 0,05$.

Apenas em Wheaton foram observadas diferenças de CB no controle em relação ao mesmo frasco com óleo mineral. Os consórcios AL1, 2 e 3 apresentaram maior CB no frasco controle (Tabela 4), com exceção do AL2 (T_{18}).

Tabela 4 – Comparação do CB dos consórcios controle e com óleo mineral incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias em frascos Wheaton analisados pelo teste T ($p<0,05$).

Consórcios	Tempo de Incubação									
	0		6		15		18		30	
AL1	c	o	c	o	c	o	c	o	c	o
AL2	c	o	c	o	c	o	c	o	c	o
AL3	c	o	c	o	c	o	c	o	c	o

0AL: Consórcios mantidos em Árabe Leve. A letra determina o maior CB: (c) CB maior no controle e (o) CB maior no óleo mineral segundo o teste T. Somente foram representadas diferenças com $p<0,05$.

Não foi encontrada correlação da TE com o CB para o querosene, gasolina ou Árabe Leve em nenhum dos consórcios inoculados em Erlenmeyer. Entretanto, no frasco Wheaton controle houve correlação inversa ($r=-1,0$; $p<0,05$) entre a TE do Árabe Leve e o CB para o AL1 (T_0) e AL3 (T_{18}) (Fig. 16 e 17). A mesma correlação ($r=-1,0$) foi encontrada para o controle do AL3 em querosene no T_{15} . Não houve correlação da TE e CB com a gasolina neste tipo de frasco.

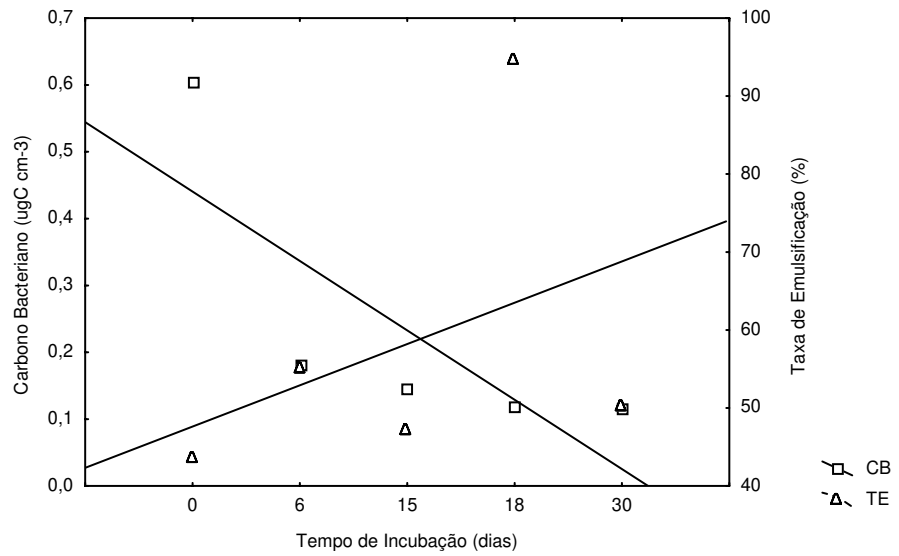


Fig. 16 - Taxa de emulsificação (TE) do Árabe Leve e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 1 controle ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton (T_0 ; $r=-1,0$; $p<0,05$).

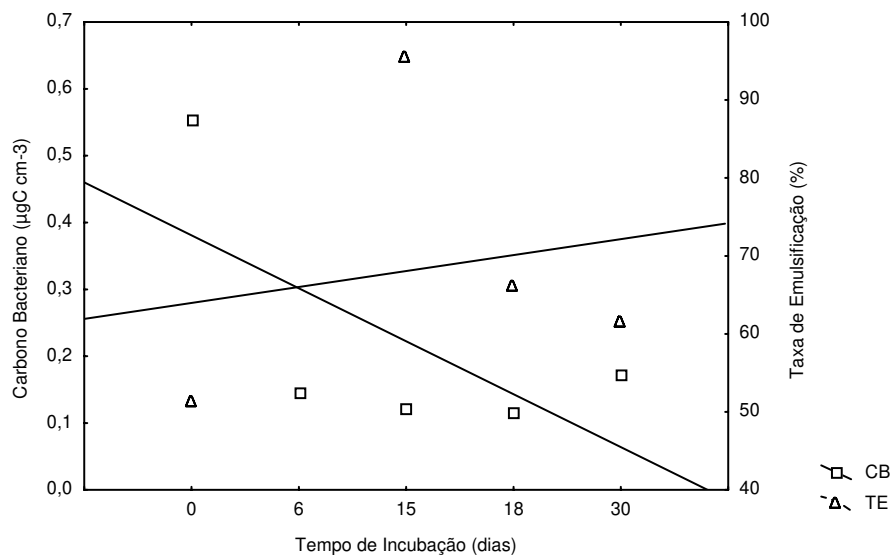


Fig. 17 - Taxa de emulsificação (TE) do Árabe Leve e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 3 controle ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton (T_{18} ; $r=-1,0$; $p<0,05$).

Na Tabela 5 está representado o tipo de emulsificação preferencial de cada composto ao longo do tempo, analisados pelo teste T ($p < 0,05$). Os maiores valores de emulsificação para o querosene e o Árabe Leve foram encontrados nos frascos Erlenmeyers controle (Tabelas 13 e 21, Anexo II b). Segundo o teste T, a presença do óleo mineral reduziu a emulsificação (A) e (B) do Árabe Leve (T18 AL1, AL2 e T30 AL3), (A) da gasolina (T18 AL1) e do querosene (T15 AL2), com exceção da emulsificação do querosene no T18 pelo AL1, que apresentou maior emulsificação no frasco com óleo mineral.

Tabela 5 – Representação da preferência de emulsificação aquosa (B) ou não aquosa (A) do querosene, gasolina e Árabe Leve ao longo do tempo para os consórcios inoculados em Erlenmeyer ($p < 0,05$ pelo teste T).

Amostras		Tempo de incubação (dias)									
		0		6		15		18		30	
AL1	Controle	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
	Óleo mineral	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
AL2	Controle	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
	Óleo mineral	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
AL3	Controle	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
	Óleo mineral	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B

AL: Consórcios mantidos em Árabe Leve. A cor determina o composto emulsificado predominantemente: azul – querosene, amarelo – gasolina e vermelho - Árabe Leve, segundo o teste T. Somente foram representadas diferenças com $p < 0,05$.

A preferência da emulsificação aquosa (B) ou não aquosa (A) dos compostos em frascos Wheaton estão representados na Tabela 6. O Árabe Leve foi o composto mais emulsificado na fase B por todos os consórcios. O querosene e a gasolina foram emulsificados preferencialmente na fase A.

Tabela 6 – Representação da preferência de emulsificação aquosa (B) ou não aquosa (A) do querosene, gasolina e Árabe Leve ao longo do tempo para os consórcios inoculados em Wheaton ($p < 0,05$ pelo teste T).

Amostras		Tempo de incubação (dias)									
		0		6		15		18		30	
AL1	Controle	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
	Óleo mineral	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
AL2	Controle	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
	Óleo mineral	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
AL3	Controle	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
	Óleo mineral	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B

AL: Consórcios mantidos em Árabe Leve. A cor determina o composto emulsificado predominantemente: azul – querosene, amarelo – gasolina e vermelho - Árabe Leve segundo o teste T. Somente foram representadas diferenças com $p < 0,05$.

Quando a emulsificação A e B em frascos Wheaton controle e com óleo foram comparados pelo teste T para cada composto, observamos preferência da emulsificação ($p < 0,05$) no controle da AL1 e AL3 para a gasolina de 0 a 15 dias e Árabe Leve do dia 15 ao 30.

7- Análise da eficiência do biossurfactante

As medidas de densidade foram utilizadas nos cálculos de TS e está apresentada no Anexo III (Tabela 25). Todos os consórcios apresentaram redução da Tensão de Superfície (TS) em relação ao controle (C) ($p < 0,05$), em ambas as concentrações de água do mar, como pode ser observado na Tabela 26 (Anexo III). Os consórcios AL2 e AL3, ao contrário do AL1, reduziram a TS quando houve aumento da salinidade de 25% para 50% (Fig. 18).

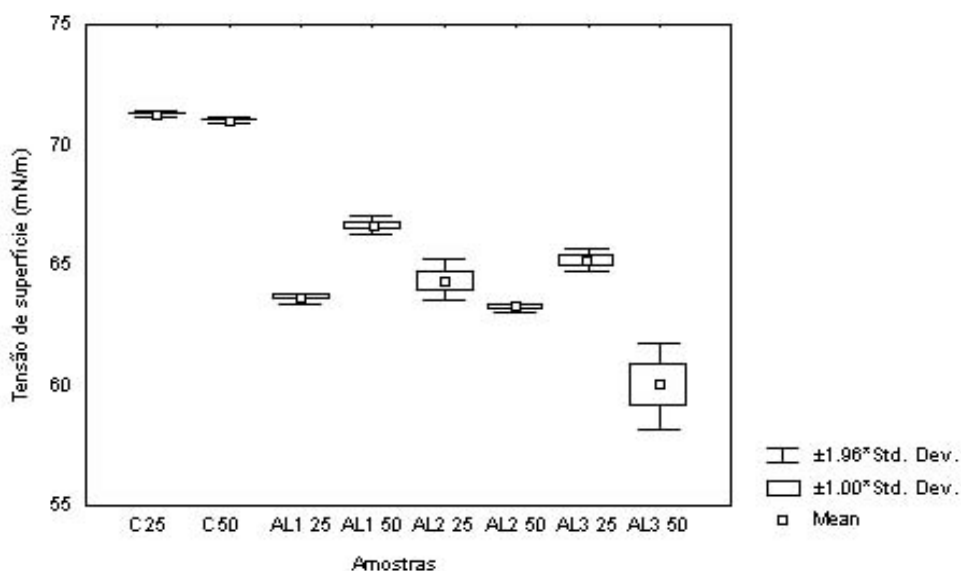


Fig. 18 – Tensão de Superfície (TS) dos consórcios (AL1, AL2 e AL3) incubados por 15 dias em meio de cultura com 25 e 50% de água do mar ($p < 0,05$). (C25 e C50: meio de cultura estéril com 25% e 50% de água do mar).

8- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A incubação de lamínulas imersas em meio de cultura favoreceu a adesão de bactérias com capacidade de formar biofilme em vidro, uma vez que estas não sofreram nenhum tratamento prévio para facilitar a adsorção bacteriana. Dessa forma, as imagens geradas pela MEV mostram consórcios com aproximadamente 1µm agrupados (Fig. 19, 20, 21 e 22).

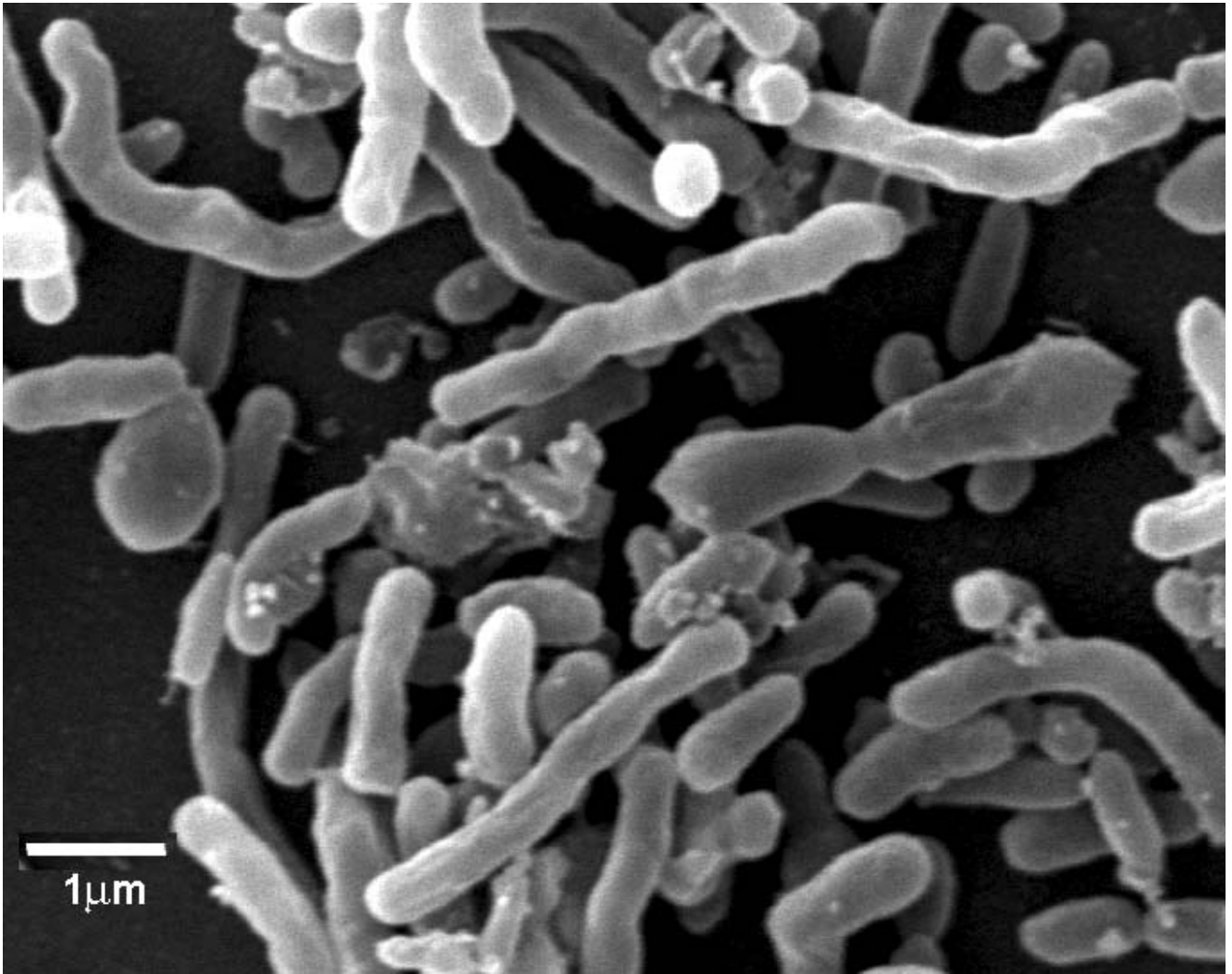


Fig. 19- Fotografia em MEV do biofilme formado pelo AL1 em lamínula de vidro após 15 dias de incubação.

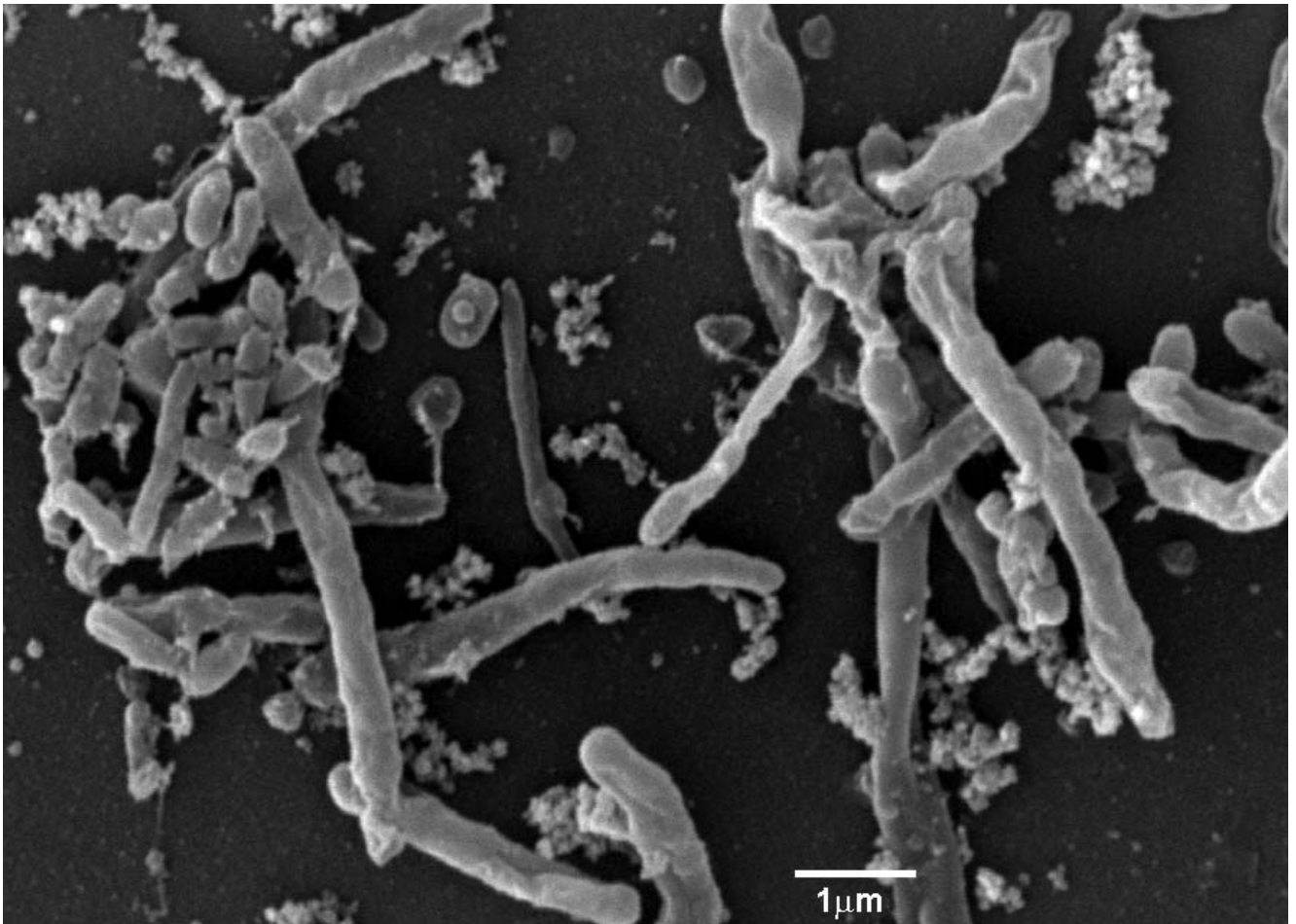


Fig. 20 - Fotografia em MEV do biofilme formado pelo AL2 em lamínula de vidro após 15 dias de incubação.

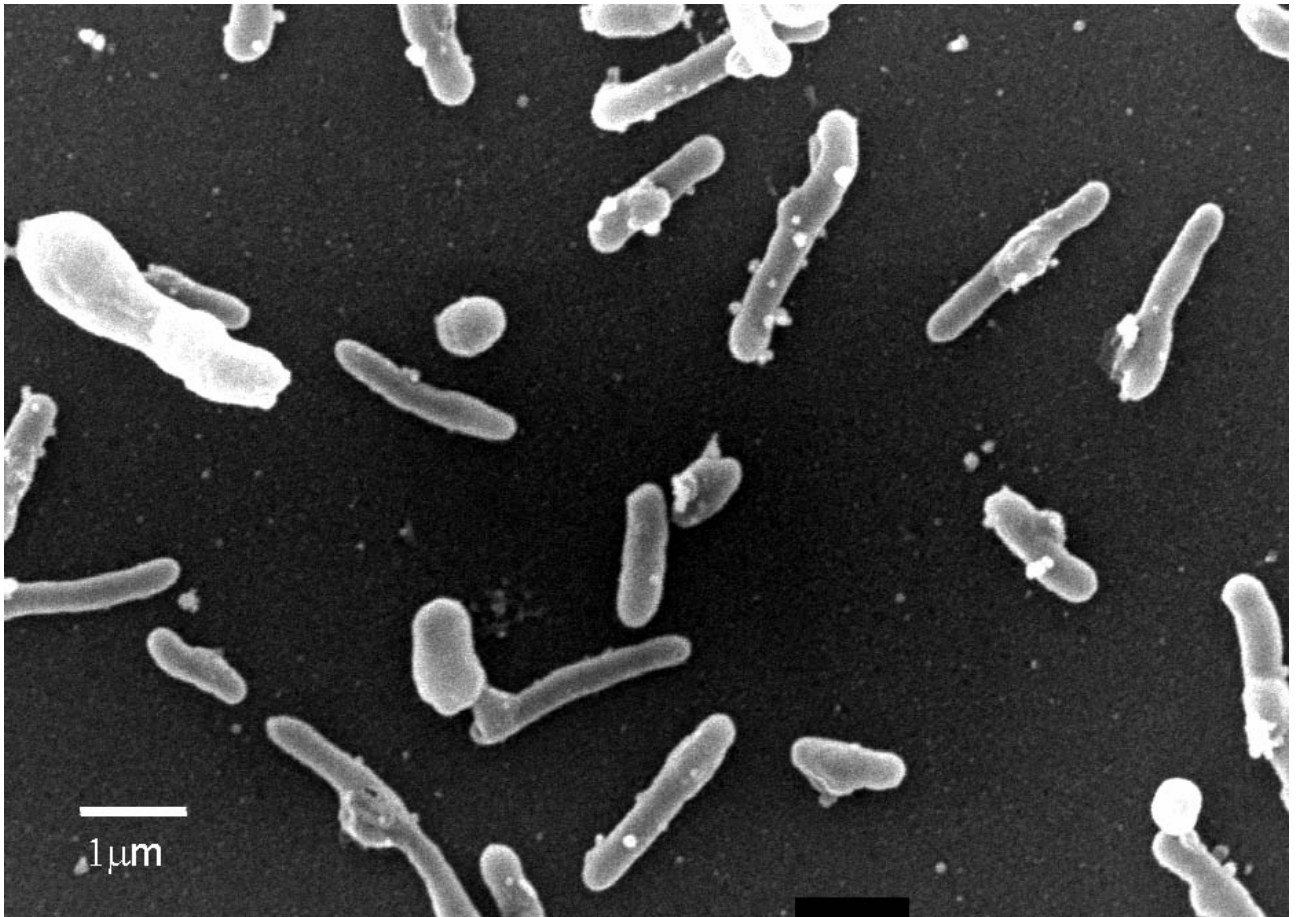


Fig. 21 - Fotografia em MEV do biofilme formado pelo AL3 em lamínula de vidro após 15 dias de incubação.

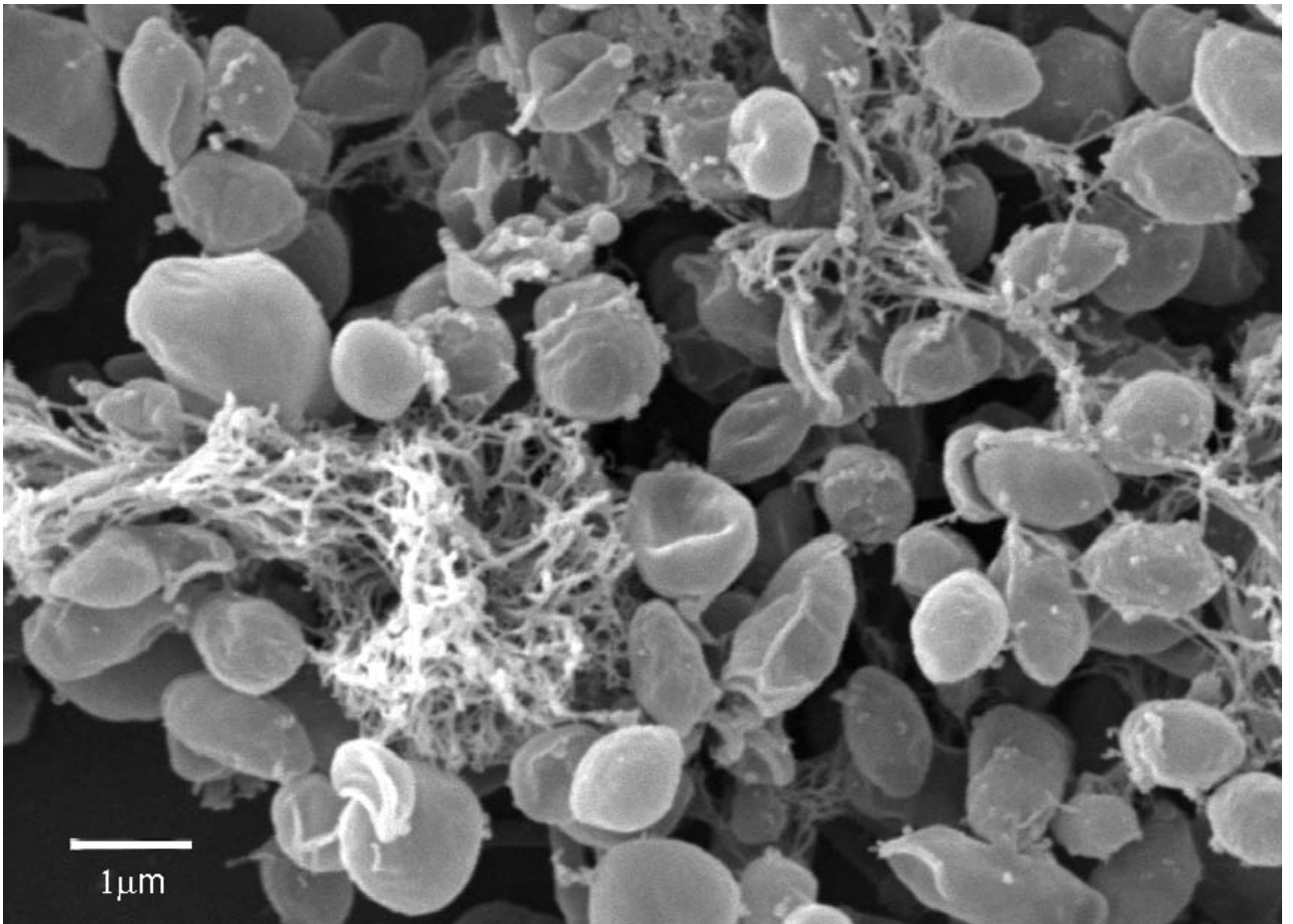


Fig. 22 - Fotografia em MEV do biofilme formado pelo S1 em lamínula de vidro após 15 dias de incubação. Reparar a “rede” formada entre as bactérias.

DISCUSSÃO

Dois anos após o derramamento de 1.292 milhões de óleo cru na Baía de Guanabara em Janeiro de 2000, isolamos consórcios bacterianos produtores de surfactante de amostras de sedimento superficial do mangue da APA de Guapimirim.

Os consórcios isolados apresentaram endósporos. O endósporo é uma célula formada no interior da célula vegetativa, altamente resistente ao calor, dessecação, entre outros agentes físico-químicos, capaz de permanecer em estado latente por longos períodos e de germinar dando origem a nova célula vegetativa. A esporulação se inicia quando os nutrientes bacterianos estão escassos, geralmente pela falta de fontes de carbono e nitrogênio. Os endósporos podem estar localizados na posição central ou terminal das células, dependendo da espécie. Em algumas bactérias esporuladas, várias enzimas, exotoxinas e antibióticos somente são produzidos durante a esporulação (Toledo & Trabulsi, 1996).

Colônias com 1 a 3 mm de diâmetro, textura mucóide e brilhosa, borda bem definida e coloração rosa-avermelhada em Agar Congo foram as características utilizadas com sucesso para a seleção dos consórcios produtores de surfactante, que foi confirmada pela formação de microemulsões na interface óleo-água e pela produção de biofilme na parte interna do tubo. A observação dos consórcios através da microscopia de epifluorescência mostra o surfactante associado à

célula na forma de cápsula (Fig. 43, Anexo IV), confirmando os dados apresentados em Agar Congo. Nas imagens de microscopia de varredura (Fig.19 e 22), pudemos observar que as células do consórcio estavam emaranhadas em uma matriz polimérica (provavelmente o surfactante), ilustrando a capacidade de produzir biofilme em vidro, como observada no teste do tubo. Essa matriz ao redor das células serve de proteção, impedindo que compostos lipofílicos entrem em contato direto com a membrana (Sikkema *et al.*, 1995). Ao que tudo indica, é evolutivamente favorável que estas bactérias hidrocarbonoclásticas sejam capazes de formar biofilme, pois além de utilizar a matriz produzida como agente surfactante, este serve como barreira para sua proteção. Esta característica é muito importante, devido a sua capacidade hidrocarbonoclástica.

O Agar Congo é um meio muito utilizado para verificar a presença de cápsulas e microcápsulas em vários microrganismos como *Staphylococcus* produtores de biofilme e *Shigella* invasiva, entre outros, uma vez que as células precipitam o corante podendo colorir a colônia de rosa a vermelho escuro (Arciola *et al.*, 2001; Wennerås *et al.*, 2000). Este meio foi eficaz na triagem de consórcios hidrocarbonoclásticos produtores de biosurfactante.

A adesão das bactérias hidrocarbonoclásticas ao óleo depende da hidrofobicidade da superfície celular, sendo fundamental para a utilização deste como fonte de carbono (Southam *et al.*, 2001). Os biosurfactantes aderidos às células, dependendo da sua orientação, podem alterar a hidrofobicidade da

superfície bacteriana. Em estudos com *Pseudomonas aeruginosa*, o raminolipídio aderido à superfície aumenta a hidrofobicidade bacteriana, enquanto, para *Acinetobacter*, a hidrofobicidade da superfície celular é reduzida pela presença do emulsificante, sugerindo a utilização do surfactante na regulação da adesão ou dessorção das superfícies de acordo com suas necessidades. Durante a fase exponencial de *A. calcoaceticus* RAG-1 crescendo em óleo cru, o emulsan é ligado à célula na forma de minicápsula. Por esta bactéria utilizar apenas *n*-alcanos para seu crescimento, quando estes compostos são completamente utilizados, a RAG-1 entra em estado carecente (“starvation”), apesar de continuar aderida a gota de óleo. Este estresse nutricional causa a liberação da minicápsula de emulsan, que envolve a gota tornando-a hidrofílica e conseqüentemente havendo a dessorção da bactéria da gota de óleo que irá à procura de nutrientes (Ron & Rosenberg, 2002). Como o surfactante interfere na hidrofobicidade de superfície celular, sua presença é fundamental para a formação do biofilme, uma vez que as células aderidas a uma superfície, podem excretar o surfactante como matriz polimérica extracelular, estabilizando esta aderência à superfície e protegendo-as da ação de agentes tóxicos.

A produção de surfactantes e aumento da biomassa foi observada tanto em meio contendo hidrocarbonetos (Árabe Leve) quanto sacarose como fontes de carbono. Entretanto a maior versatilidade metabólica foi apresentada pelos consórcios mantidos em Árabe Leve (26% dos tubos com crescimento). A

exposição prévia de bactérias ao contaminante, sem a adição de nutrientes ao meio de cultura, selecionou o crescimento de amostras mais resistentes e produtoras de surfactantes (Francy *et al.*, 1991; Crapez *et al.*, 2000).

Sikkema *et al.* (1995) sugerem o envolvimento de enzimas intracelulares na degradação de hidrocarbonetos, sendo necessária a entrada de substratos na célula para que estes possam ser metabolizados. A membrana citoplasmática tem baixa permeabilidade para moléculas polares e carregadas, porém, compostos apolares como os hidrocarbonetos podem penetrar facilmente na membrana, podendo causar danos irreversíveis a célula, como a perda da integridade e a dissipação da força protônica.

Bacillus produzem enzimas hidrolíticas extracelulares que clivam polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídeos, utilizando-os como fonte de carbono e doadores de elétrons (Ron & Rosenberg, 2002; Davis *et al.*, 1999; Martinko *et al.*, 1997, Parkinson, 1985). Substâncias como GAL, LAC, GLI, OXA, CIT, AB e ASP que também dependem de entrada na célula para serem degradados, foram testados, para verificar se o isolamento e manutenção em hidrocarbonetos de petróleo afetaria o transporte. O AB é muito utilizado na indústria alimentícia como conservante. Tem afinidade lipofílica e age dissipando o gradiente de pH da membrana, podendo atuar no DNA e em enzimas. Em *Pseudomonas putida*, a entrada deste se dá por transporte ativo (Sikkema *et al.*, 1995). Esta afinidade

lipofílica causando danos a membrana celular, pode ser a explicação do não crescimento dos consórcios neste composto de 15 a 60 dias (exceção do AL3).

Provavelmente, o crescimento de todos os consórcios em meio contendo ASP e AB apenas nos 6 primeiros dias de incubação, pode ter sido mascarado pela presença de uréia no meio, que é facilmente consumida. Após este período, somente o AL3 apresentou habilidade de utilizar estes dois compostos como fonte de carbono. Crapez *et al* (2000) estudando o impacto agudo e crônico causado por HPAs em comunidades bacterianas isoladas de dois pontos da Baía de Guanabara, mostraram que estas utilizavam o AB quando submetidas a impacto agudo, aumentando consideravelmente a biomassa. Em acordo, acreditamos que a capacidade de crescer em *Árabe Leve* assegurou maior habilidade para síntese de enzimas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos, em relação aos consórcios mantidos em sacarose.

Foi observado que compostos lipofílicos estimulam a atividade de ATP-ase translocadora de íons, causando a perda da barreira de prótons da membrana, prejudicando a homeostase do pH, alterando o transporte celular e por fim, impedindo sua viabilidade. O pronunciado crescimento dos consórcios em GAL, GLI e CIT após 30 dias, indica a viabilidade dessas células, que foram capazes de efetuar a síntese e manutenção de vários transportadores, em presença de óleo. O tempo de incubação se mostrou importante para a determinar a capacidade da utilização da fonte de carbono para o crescimento bacteriano.

Foram realizados dois ensaios preliminares independentes para determinar a biomassa surfactante, que consistiram em quantificar a população bacteriana por 5 dias e acompanhar a biomassa surfactante em 15 dias. No primeiro observamos a redução no número de esporos, seguido pelo aumento do carbono bacteriano, com produção de surfactante no quinto dia. No segundo ensaio observamos aumento da TE ao longo dos 15 dias, juntamente do aumento da biomassa, exceto para a amostra que apresentou agregação.

Em estudos com a produção de biosurfactantes por bactérias Gram-positivas, utilizando óleo diesel como fonte de carbono, foi encontrado TE máxima de 12,00% (Cassidy & Hudak, 2001). *Rhodococcus spp.*, isolados de sítios contaminados com óleo diesel e utilizando extrato de levedura, glicose e lactose como fontes de carbono, apresentaram emulsificação entre 10,00 e 60,00% (Bicca *et al.*, 1999). Nossos consórcios mantidos em Árabe Leve apresentaram em 15 dias a TE variando de 16,20 a 86,30%. Essas altas taxas apresentadas pelos consórcios mantidos em Árabe Leve estão indicando a capacidade de emulsionar o petróleo e seus derivados.

Todos os consórcios emulsionaram a gasolina e o querosene na fase oleosa (A) independente do tempo (6 ou 15 dias). Winsor classificou a formação de microemulsões de água no óleo (A) como tipo II. Seguindo esta classificação, a emulsificação do Árabe Leve em 15 dias foi exclusivamente do tipo óleo em

água (I). Apenas o S2 apresentou emulsão do tipo III (em ambas as fases) para a gasolina em 6 e querosene em 15 dias.

Segundo Parkinson (1985), a presença de hidrocarbonetos não é crítica para a produção de surfactantes em todos os organismos. A função e liberação dos biossurfactantes estão relacionadas com o consumo do hidrocarboneto, apesar de alguns biossurfactantes serem produzidos em compostos como glicose, sacarose e etanol (Banat, 1995). De acordo com nossos resultados, a intensidade da emulsificação variou entre os consórcios mantidos em Árabe Leve e em sacarose, indicando que a fonte de carbono pode interferir na produção de biossurfactante.

Esta etapa anterior foi fundamental para a padronização da metodologia utilizada neste trabalho. A partir dela foi possível detectar a produção de biossurfactante entre os consórcios selecionados, o tempo de incubação, o protocolo mais adequado para medir a TE e principalmente, indicou que a produção de biossurfactante estava relacionada com a biomassa bacteriana. Alguns autores defendem que os microrganismos produzem uma variedade de biossurfactantes em geral na fase estacionária de crescimento, pois sua síntese apenas será ativada quando a população atingir a biomassa necessária, “quorum-sensing” (Rahman *et al.*, 2002; Ron & Rosenberg, 2002). Contrariamente, Parkinson (1985) relata que na fermentação de *Bacillus* produtores de surfactantes, a adição de hidrocarbonetos ao meio de cultura, apesar de aumentar

a biomassa, reduziu a produção de surfactantes. A aglutinação apresentada pela amostra S1 pode ser explicada pela alta hidrofobicidade de superfície causada pelo surfactante, fazendo com que as células sejam repelidas pelas moléculas da água, indo de encontro umas com as outras, propiciando a aglutinação.

Para a obtenção de uma emulsão estável entre dois líquidos puros e imiscíveis como benzeno e água é necessária a presença de um surfactante. Sem o surfactante, após agitados vigorosamente e colocados em repouso, as duas fases se separam rapidamente (Adamson, 1990). A formação de emulsões da gasolina, querosene e Árabe Leve em água, indica a presença de biossurfactante bacteriano no sistema.

Para estimular a produção de biossurfactante em produção, a concentração da água do mar do meio de cultura foi reduzida de 75% para 50% e 25%. A redução da salinidade de 75% para 50% de água do mar facilitou a visualização do biossurfactante produzido. Entretanto, contrariando nossas expectativas, a redução para 25% de água do mar pode ter interferido negativamente na produção de surfactante, uma vez que os consórcios foram isolados de sedimento de mangue e mantidos em meio com 75% de água do mar. Tendo em vista que o estresse parece interferir positivamente na produção de surfactante, a redução da salinidade não foi uma boa condição para estimular a produção.

A partir do ensaio de tempo de incubação foi possível determinar o período para a realização das medidas de emulsificação. Como as melhores taxas

variaram entre os consórcios, o tipo de composto e o tempo de incubação, o critério utilizado foi escolher datas intermediárias que a maioria dos consórcios apresentasse alta taxa de emulsificação. Houve aumento da TE ao longo do tempo, sendo que os melhores valores foram encontrados em 9, 15 e 24 dias. Sendo assim, os dias padronizados para a leitura da emulsificação e CB nos ensaios de emulsificação foram 6, 15, 18 e 30 dias.

Todos os consórcios apresentaram aumento TE até 24 dias em média e redução do CB ao longo do tempo, independente do composto testado. Apenas o AL3 apresentou TE do Árabe Leve máxima com o CB mínimo nos dias 15 e 18. Entretanto, Nadarajah *et al* (2001) encontraram correlação positiva entre a de-emulsificação e a contagem celular, mostrando que a de-emulsificação depende mais da densidade bacteriana do que da idade do inóculo, uma vez que culturas antigas podem possuir superfície hidrofóbica. Esta diferença de resultados deve estar ligada à formação de biofilme na base do frasco utilizado, reduzindo desta forma, o número de bactérias livres no sobrenadante ao longo do tempo, apesar do aumento da produção de biosurfactante. O frasco Wheaton utilizado neste experimento tinha base achatada e sua forma cilíndrica garantiu a aeração no sistema, favorecendo a síntese de surfactante (Fig. 9). A formação do biofilme pode ser causada por inúmeros fatores como, por exemplo, hidrofobicidade/hidrofilicidade da célula, a presença de adesinas e/ou pela simples vantagem da criação de microambientes com características físico-

químicas e nutricionais propícias a elas. Nos ensaios não houve formação de biofilme aderido à base do frasco, quando as amostras foram incubadas em frascos Erlenmeyers, durante a padronização do experimento.

O Árabe Leve foi emulsificado na fase B (Winsor tipo I), enquanto a gasolina e o querosene foram preferencialmente emulsificados na fase A (Winsor II). Paraszkievicz *et al.* (2002), encontraram variação do tipo de emulsão II ou I do querosene dependendo do tempo de incubação, analisando os filtrado de todas as fases de crescimento do fungo *Curvularia lunata*, produtor de emulsificante. Em nossos resultados, o tempo não influenciou no tipo de emulsão formada, mas sim em sua intensidade, que também é dependente das características químicas de cada composto hidrofóbico testado.

A constituição de cada composto utilizado é bem diferente, sendo assim, possuem comportamento diferente frente ao surfactante. Devido a dificuldade de acesso a informações sobre as características dos combustíveis fica muito complicado compará-los. A gasolina utilizada nos ensaios é a distribuída em postos. A gasolina comum C é constituída de uma mistura de gasolina A, 22% de etanol anidro, com máxima de 1,0% de benzeno e 57% de hidrocarbonetos policíclico aromático. Especificações do tipo do querosene utilizado não foram encontradas. Porém, o querosene de aviação é constituído de 25% de HPA, sendo um pouco mais puro que a gasolina, enquanto o árabe leve é uma mistura de substâncias como benzeno, tolueno e xileno na razão de 7,97, rica em

hidrocarbonetos saturados e aromáticos, assim como metais pesados e sais entre outras (Nunes & Bonomi, 2002).

Devido à formação de biofilme na base do frasco no ensaio anterior, não foi possível encontrar bactérias em suspensão, ao contrário do observado nos primeiros ensaios para padronização de metodologia. Para determinar se havia influência do tipo de frasco e da quantidade de oxigenação na produção de surfactante, a TE e o CB foram realizados ensaios em dois frascos com formatos diferentes (Fig. 9), sendo, que a cada um deles, foi adicionada uma camada fina de óleo mineral sobre o meio de cultura, para evitar trocas gasosas.

Para a gasolina não houve diferença entre os valores de TE nos dois frascos. Entretanto, para querosene e Árabe Leve, foram observadas diferenças em relação a presença de óleo mineral e ao tipo de frasco. Nos frascos Erlenmeyers, a TE do Árabe Leve foi mais alta no controle, onde não havia a presença de óleo. Entretanto, nos frascos Wheaton, as menores TE e CB foram obtidas no controle. O óleo mineral nos frascos Wheaton, juntamente com a superfície rugosa do vidro, favoreceu a adesão da dessas células no fundo e/ou ao óleo, acarretando estimativas parciais da biomassa e da TE. Estes resultados também são indicativos de síntese aeróbia de biosurfactantes pelos consórcios isolados. A emulsificação da gasolina, do querosene e do Árabe Leve foi influenciada pelo frasco utilizado. Os maiores valores foram encontrados em

Erlenmeyers controle, exceto para a AL1. Sikkema *et al.* (1995) afirmam que o óleo mineral reduz a atividade microbiana no ambiente.

O aumento da salinidade influenciou na tensão de superfície de 2 consórcios testados (AL2 e AL3). Segundo Franczy *et al.* (1991), para um consórcio ser considerado como bom produtor de emulsificante é necessária redução da TS em relação ao controle $>10 \text{ dynes.cm}^{-1}$ (10mN.m^{-1}). Todos os consórcios apresentaram redução da TS, porém apenas a amostra AL3, inoculada em água do mar a 50%, apresentou redução maior que 10mN.m^{-1} , mostrando-se como uma boa produtora de biosurfactante.

Além da produção de antibióticos, com potentes propriedades surfactantes, podendo reduzir a TS da água até 27 mN.m^{-1} (surfactina de *Bacillus subtilis*), ou com propriedades de detergentes catiônicos (polimixina B de *P. polymixa*) (Christofi & Ivshina, 2002; Ron & Rosenberg, 2002; Davis *et al.*, 1999; Parkinson, 1985), já foi descrito crescimento anaeróbio, apesar de serem aeróbios estritos (Davis *et al.*, 1999). Para a completa biodegradação é necessária a ação simultânea de diversas populações, já que cada bactéria degrada um limitado grupo de hidrocarbonetos (Crapez *et al.*, 2000; Nadarajah *et al.* 2001). Estes foram os fatores que incentivaram o isolamento de consórcios deste gênero para o estudo.

Apesar de algumas dificuldades na determinação da biomassa total em amostras hidrofóbicas formadoras de biofilme, esta técnica continua sendo uma

boa opção, uma vez que somente através da observação em microscópio podemos caracterizar as colônias como consórcio, descrever a morfologia bacteriana e, dependendo do corante utilizado, determinar a viabilidade destas. As metodologias empregadas (Fig. 42, Anexo IV) se mostraram eficientes no isolamento, triagem, amplificação de biomassa, manutenção e caracterização dos consórcios produtores de biossurfactantes.

CONCLUSÕES

- A metodologia se mostrou adequada para nossos objetivos, o Erlenmeyer foi o melhor frasco para os testes de taxa de emulsificação, uma vez que não favoreceu a aderência das bactérias;
- Foi possível isolar consórcios bacterianos hidrocarbonoclásticos produtores de surfactante baseado nas características das colônias. Estes consórcios se mostraram adequados para o trabalho, devido a facilidade de cultivo e de resistência;
- A produção de surfactante é independente da fonte de carbono, mas a intensidade da produção é dependente. Os consórcios isolados em Árabe Leve possuem maior potencial de produção que os mantidos em sacarose;
- O Árabe Leve selecionou as populações dos consórcios com maior habilidade de utilizar os hidrocarbonetos e com maior versatilidade metabólica;
- A redução da salinidade não foi uma boa condição para estimular a produção. A maior redução da TS foi encontrada em meio de cultura com 50% de água do mar.
- Bactérias formadoras de cápsulas mostraram produção de surfactante e biofilme. A matriz extracelular do biofilme dessas bactérias, além de proteger parece ter ação surfactante, interferindo provavelmente na hidrofobicidade da superfície celular, tornando as células hidrofóbicas, facilitando a adesão ao óleo e a outras superfícies;

- Nossos consórcios foram capazes de emulsionar os compostos, havendo aumento da produção do biossurfactante ao longo do tempo, apesar do tipo de emulsificação (A e B) para cada composto não variar com o tempo, mas com sua composição.

REFERÊNCIAS

- ADAMSON, A. W. Emulsions, foams and aerosols. *In: Physical Chemistry of surfaces*, Wiley-Interscience, USA, 1990, p. 525-553.
- ARCIOLA, C. R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* Genes and Slime Production in a Collection of Staphylococcal Strains from Catheter-Associated Infections. *J Clin Microbiol.* 2001, v. 39, p. 2151-2156.
- BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. *Biores Technol* 1995, v. 51, p. 1-12
- BELLOCQ, A.M.; BIAIS, J.; BOTHOREL, P.; CLIN, B; FOURCHE, G.; LALANNE, P.; LEMAIRE, B.; LEMANCEAU, B; ROUX, D. *Adv. Coll. Interf. Sci.* 1984, v.20, p. 167-272.
- BOEK, D.; INDIVINO, E.; MARSO, K.; SMOLLAR, K. Colloidal and Surface Phenomena of Liquid Laundry Detergent. 2002, http://www.ub.rug.nl/eldoc/dis/science/j_kevelam/c1.pdf,
- BICCA, F.C., FLECK, L.C., AYUB, M.A.Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Rev. Microbiol.* v. 30, p. 231-236, 1999.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Coll. Surf. A; Physicochem. Eng Aspects.* 1999, v. 152, p. 41-52.
- BONIN, P.; RONTANI, J. F.; BORDENAVE, L. Metabolic differences between attached and free-living marine bacteria: inadequacy of liquid cultures for describing in situ bacterial activity. *FEMS Microbiol Lett*, v. 194, p. 111-119, 2001.

- BOTELHO, A. L. M. Análise da contaminação por óleo na APA de Guapimirim – RJ. Aspectos geoquímicos e Sócio ambientais. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Marinha. Universidade Federal Fluminense. 95 p. 2003.
- CARLUCCI, A. F.; CRAVEN, D. B.; ROBERTSON, D. J.; WILLIAMS, P. M. Surface-film microbial populations diel amino acid metabolism, carbon utilization and growth rates. *Mar. Biol.*, 1986, v. 92, p. 289-297.
- CASSIDY, D. P. & HUDAK, A. J. Microorganism selection and biosurfactant production in a continuously and periodically operated bioslurry reactor. *J. Haz. Mater.*, 2001, B84: 253-264.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999, v. 284, p. 1318-1322.
- CRAPEZ, M. A. C. Efeitos dos hidrocarbonetos de petróleo na microbiota marinha. *In: Efeitos dos poluentes em organismos marinhos*. R. Moraes *et al* (Eds) Arte e Ciência – Vilipress, 2001, p 253-267.
- CRAPEZ, M. A. C.; TOSTA, Z. T; BISPO, M. das G. S.; PEREIRA, D. C. Acute and chronic impacts caused by aromatic hydrocarbons on bacterial communities at Boa Viagem and Forte do Rio Branco Beaches, Guanabara Bay, Brasil. *Environm. Poll.* 2000, v. 108, p 291-295.
- CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in fields studies of soil remediation. *J. Appl. Microbiol.* 2002, v. 93, p. 915-929.
- DAVIS, D. A.; LYNCH, H. C.; VARLEY, J. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enz. Microb. Technol.* 1999, v. 25, p. 322-329.

- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol. Rev.* 2002, v. 15, p. 167-193.
- 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. *Mar. Poll. Bull.*, v. 41, p. 403-412, 2000.
- DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev*, v. 15, p. 155-166, 2002.
- EVANS; FENNELL; STOKES, R. *Fundam. Interf Eng*, Wiley, Canada, 1997.
- FRANCY, D. S.; THOMAS, J. M.; RAYMOND, R. L.; WARD, C. H. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *J Ind. Microbiol*, 1991, v.8, p.237-246.
- KEPNER, J.R.; PRATT, J. R. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiol. Rev.*, 1994, v. 58, p. 603-615.
- LALLI, A. M.; PARSONS, T. R. Human Impacts on Marine Biota. *In: Biological oceanography an introduction*. The Open University, 1992, p. 248-263.
- LIBES S. M. The fate of pollutants in the coastal ocean. *In: An introduction to marine biogeochemistry*. SM Libes (ed) John Wiley & sons, Inc., 1992, p.597-647.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Prokaryotic Diversity: Bacteria; *In: Brock Biology of Microorganisms*. 1997. Prentice Hall; USA; p. 635-740.
- MARSHAL, K. C. *Interfaces in microbial ecology*. Harvard University press, Cambridge, Mass. 1976, p. 44-47.
- MEYER-REIL, L.A. Microbial life in sedimentary biofilms – the challenge to microbial ecologists. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1994, v. 112, p. 303-311.

- MICHEL, J. Assessment and recommendations for the oil spill Cleanup of Guanabara Bay, Brazil. *Spill Sci. Technol. Bull.*, 2000, v. 6, p. 89-96.
- MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Heavy metals removal from sediments by biosurfactants. *J Harz Mat.* 2001. v. 85, p. 111-125.
- NADARAJAH, N; SINGH, A.; WARD, O. W. De-emulsification of petroleum oil emulsion by a mixed bacterial culture. *Process Biochem.* 2002, v. 37, p. 1135-1141.
- NUNES, L. S. & BONOMI, A.M.F. Qualidade dos Combustíveis Comercializados no Brasil. *Conjuntura & Informação*, 2002, n.º 19, p.11-17
- NYBAKKEN. Human impact on sea. *In Marine Biology an ecological approach.* 1992, p. 418-445.
- PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A.; DLUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *J. Biotech.* 2002, v. 92, p. 287- 294.
- PARKINSON, M. Bio-surfactants. *Biotech Adv.* 1985, v. 3, p. 65-83.
- RAHMAN, K. S. M.; BANAT, I. M.; THAHIRA, J.; THAYUMANAVAN, T.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litte, coir pith and rhaminolipid biosurfactant. *BioresTechnol*, 2002, 81: 25-32.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr Opin Biotechnol.* 2002, v. 3, p. 249-252.
- SIKKEMA, J.; BONT, J. A M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. 1995, *Microbiol. Reviews*, v. 59, p. 201-222.

- SOUTHAM, G.; WHITNEY, M.; KNICKERBOCKER, C. Structural Characterization of the hydrocarbon degrading bacteria-oil interface: implications for bioremediation. *Intern Biodet Biodeg.*, 2001, v. 47, p. 197-201.
- TOLEDO, M. R. F.; TRABULSI, L. R.; Outras Bactérias Aeróbias e Anaeróbias Facultativas; In: *Microbiologia*, Trabulsi (Eds), Editora Atheneu, 1997; p. 173-176.
- WATANABE, K. Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr Opin Biotechnol.* 2001, v. 12, p. 237-241.
- WATARAI, H. Microemulsion in separation science. *J Chromat A*, 1997, v.780, p. 93-102.
- WENNERÅS, C.; AVE, P.; HUERRE, P.; ARONDEL, J.; ULEVITCH, R. J.; MATHISON, J. C.; SANSONETTI P. Blockade of CD14 Increases Shigella-Mediated Invasion and Tissue Destruction. *J Immunol.* 2000, v. 164, p. 3214-3221.

ANEXO I

Tabelas: Primeira etapa

Tabela 1 – Quantificação de endósporos dos consórcios produtores de surfactantes por cm^{-3} ao longo de 5 dias.

Consórcios	Tempo de Incubação em dias					
	0	1	2	3	4	5
AL1	$3,38 \times 10^8$	$5,03 \times 10^7$	$5,83 \times 10^7$	$4,08 \times 10^7$	$2,38 \times 10^7$	$1,94 \times 10^7$
AL2	$4,19 \times 10^7$	$2,93 \times 10^7$	$1,59 \times 10^7$	$1,22 \times 10^7$	$1,45 \times 10^7$	$4,12 \times 10^7$
AL3	$2,18 \times 10^8$	$5,43 \times 10^7$	$2,96 \times 10^7$	$2,49 \times 10^7$	$2,36 \times 10^7$	$4,84 \times 10^6$
S1	$6,34 \times 10^7$	$2,07 \times 10^7$	$1,42 \times 10^7$	$1,16 \times 10^7$	$4,73 \times 10^6$	$2,67 \times 10^6$
S2	$5,62 \times 10^7$	$1,76 \times 10^7$	$9,57 \times 10^6$	$4,22 \times 10^6$	$4,22 \times 10^6$	$2,67 \times 10^6$
S3	$4,94 \times 10^7$	$1,91 \times 10^7$	$6,64 \times 10^6$	$6,69 \times 10^6$	$2,37 \times 10^6$	$2,06 \times 10^6$

AL: Consórcios mantidos com Áraabe Leve como fonte de carbono; S: Consórcios mantidos com sacarose como fonte de carbono.

Tabela 2 - Carbono bacteriano dos consórcios produtores de surfactantes em $\mu\text{g C. cm}^{-3}$ ao longo de 5 dias.

Consórcios	Tempo de Incubação em dias					
	0	1	2	3	4	5
AL1	0,84	1,95	1,69	2,26	2,06	2,78
AL2	2,10	1,73	1,25	1,28	1,49	1,29
AL3	0,68	1,96	1,55	1,90	2,17	1,17
S1	2,48	2,23	1,63	1,59	2,03	0,97
S2	2,78	1,67	1,96	1,51	2,64	1,76
S3	1,68	1,30	1,27	1,45	1,32	0,68

AL: Consórcios mantidos com Áraabe Leve como fonte de carbono; S: Consórcios mantidos com sacarose como fonte de carbono.

Tabela 3 – Média da taxa de emulsificação da gasolina, querosene e Áraabe Leve por consórcios isolados de sedimento de mangue com 6 e 15 dias de incubação.

Consórcios	TE(%)					
	gasolina		querosene		Áraabe Leve	
	6 dias	15 dias	6 dias	15 dias	6 dias	15 dias
AL1	22,10	85,40	0,00	26,80	38,40	33,30
AL2	28,90	44,00	44,30	46,40	0,00	30,70
AL3	76,90	86,30	0,00	16,20	0,00	36,40
S1	36,90	53,90	0,00	3,30	0,00	34,00
S2	48,90	36,00	10,30	32,30	0,00	33,40
S3	43,90	29,20	0,00	28,50	10,40	42,10

AL: Consórcios mantidos com Áraabe Leve como fonte de carbono; S: Consórcios mantidos com sacarose como fonte de carbono; TE: taxa de emulsificação com 24 horas de repouso.

Tabela 4 – Média da taxa de emulsificação não aquosa A (%) da gasolina, querosene e Árabe Leve por consórcios isolados de sedimento de mangue com 6 e 15 dias de incubação.

Consórcios	A (%)					
	gasolina		querosene		Árabe Leve	
	6 dias	15 dias	6 dias	15 dias	6 dias	15 dias
AL1	14,90	58,80	0,00	0,00	40,00	0,00
AL2	49,00	96,00	74,20	56,70	0,00	0,00
AL3	71,40	94,10	0,00	26,40	0,00	0,00
S1	51,40	53,70	0,00	5,50	0,00	0,00
S2	59,30	73,80	16,50	33,30	0,00	0,00
S3	75,90	45,10	0,00	28,90	8,80	0,00

AL: Consórcios mantidos com Árabe Leve como fonte de carbono; S: Consórcios mantidos com sacarose como fonte de carbono; A: emulsificação de fase não aquosa.

Tabela 5 – Média da taxa de emulsificação aquosa B (%) da gasolina, querosene e Árabe Leve por consórcios isolados de sedimento de mangue com 6 e 15 dias de incubação.

Consórcios	B (%)					
	gasolina		Querosene		Árabe Leve	
	6 dias	15 dias	6 dias	15 dias	6 dias	15 dias
AL1	33,80	100,00	0,00	42,70	33,30	38,60
AL2	15,90	0,00	0,00	22,00	0,00	34,60
AL3	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	41,80
S1	0,00	68,90	0,00	0,00	0,00	38,80
S2	55,60	0,00	0,00	31,80	0,00	38,80
S3	27,77	16,00	0,00	0,00	8,00	46,40

AL: Consórcios mantidos com Árabe Leve como fonte de carbono; S: Consórcios mantidos com sacarose como fonte de carbono; B: emulsificação de fase aquosa.

Tabela 6 – Carbono bacteriano dos consórcios produtores de surfactantes em $\mu\text{g C. cm}^{-3}$ em 0, 6 e 15 dias.

Consórcios	Tempo de Incubação (dias)		
	0	6	15
AL1	1,78	2,19	4,70
AL2	1,33	2,75	4,16
AL3	2,21	0,98	1,74
S1	2,98	1,41	1,24
S2	1,62	2,08	4,09
S3	1,52	2,16	4,40

AL: Consórcios mantidos com Árabe Leve como fonte de carbono; S: Consórcios mantidos com sacarose como fonte de carbono.

ANEXO II a

Tabelas e Gráficos: Tempo de Incubação

Tabela 7 - Taxa de Emulsificação do querosene (TE%) e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ dos consórcios incubados por 30 dias.

Consórcio	Parâmetro	Tempo de Incubação (dias)											
		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	70
AL1	CB	0,60	0,10	0,18	0,14	0,17	0,14	0,12	0,47	0,07	0,18	0,12	0,15
	TE	55,39	59,72	70,67	82,66	46,51	90,34	61,79	53,36	82,96	89,98	75,37	99,56
AL2	CB	0,26	0,10	0,16	0,11	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,05
	TE	62,92	80,77	71,47	90,73	58,09	94,20	63,28	90,22	92,49	91,56	70,82	94,56
AL3	CB	0,55	0,16	0,15	0,17	0,19	0,12	0,12	0,23	0,12	0,12	0,17	0,10
	TE	69,21	64,76	82,78	87,28	71,27	90,68	55,77	85,72	89,30	74,75	53,14	70,15

AL: Consórcios mantidos com Áraabe Leve como fonte de carbono; TE: taxa de emulsificação com 24 horas de repouso; CB: Carbono bacteriano.

Tabela 8 - Taxa de Emulsificação não aquosa (A%) e aquosa (B%) do querosene pelos consórcios incubados por 30 dias.

Consórcio	Tipo de Emulsificação	Tempo de Incubação (dias)											
		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	70
AL1	A	55,12	64,92	84,98	82,67	69,18	96,12	86,68	63,13	100,00	89,12	90,97	99,28
	B	55,01	52,78	52,02	82,51	16,67	85,60	46,04	39,62	67,83	80,64	54,12	100
AL2	A	82,78	78,02	85,13	94,60	87,04	95,35	94,94	94,81	94,05	95,45	72,25	87,20
	B	61,11	80,65	54,40	86,36	35,00	95,70	21,44	83,33	83,33	80,65	46,04	94,44
AL3	A	62,70	80,17	87,94	93,97	90,39	94,96	69,58	96,35	100,00	78,25	69,07	100
	B	77,16	45,56	78,47	72,76	46,66	84,60	35,56	72,25	87,78	61,83	84,53	65,42

AL: Consórcios mantidos com Áraabe Leve como fonte de carbono; A: emulsificação da fase não aquosa; B: emulsificação da fase aquosa.

Tabela 9 - Taxa de Emulsificação da gasolina (TE%) e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ pelos consórcios incubados por 30 dias.

Consórcio	Parâmetros	Tempo de incubação (dias)											
		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	70
AL1	CB	0,60	0,10	0,18	0,14	0,17	0,14	0,12	0,47	0,07	0,18	0,12	0,15
	TE	41,45	34,68	68,79	80,64	23,19	84,78	92,92	56,84	88,36	83,26	71,94	100,00
AL2	CB	0,26	0,10	0,16	0,11	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,05
	TE	83,15	57,50	64,55	84,16	39,94	91,30	98,08	76,82	72,50	85,85	86,48	100,00
AL3	CB	0,55	0,16	0,15	0,17	0,19	0,12	0,12	0,23	0,12	0,12	0,17	0,10
	TE	53,99	38,57	74,89	80,31	71,69	85,72	80,32	47,28	81,36	75,32	67,01	82,52

AL: Consórcios mantidos com Árabe Leve como fonte de carbono; TE: taxa de emulsificação com 24 horas de repouso; CB: Carbono bacteriano.

Tabela 10 - Taxa de Emulsificação não aquosa (A%) e aquosa (B%) da gasolina pelos consórcios incubados por 30 dias.

Consórcio	Tipo de Emulsificação	Tempo de incubação (dias)											
		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	70
AL1	A	3,16	54,12	79,86	75,91	35,00	68,24	95,24	75,46	96,67	87,62	88,24	100,00
	B	72,47	62,67	49,34	92,80	15,38	96,83	90,19	74,24	84,00	72,50	62,61	100,00
AL2	A	82,16	40,95	85,71	88,86	69,45	93,55	97,92	94,89	95,56	92,75	96,97	98,92
	B	84,00	68,28	65,63	81,03	17,68	89,61	98,33	60,17	71,56	81,34	85,38	100,00
AL3	A	23,70	51,59	94,76	77,78	82,19	77,30	96,58	62,36	88,30	72,22	77,40	97,92
	B	78,98	42,02	58,97	81,94	69,69	91,75	66,203	87,44	74,69	75,92	56,89	75,00

AL: Consórcios mantidos com Árabe Leve como fonte de carbono; A: emulsificação da fase não aquosa; B: emulsificação da fase aquosa.

Tabela 11- Taxa de Emulsificação do Árape Leve (TE%) e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ pelos consórcios incubados por 30 dias.

Consórcio	Parâmetros	Tempo de incubação (dias)											
		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	70
AL1	CB	0,60	0,10	0,18	0,14	0,17	0,14	0,12	0,47	0,07	0,18	0,12	0,15
	TE	43,66	45,34	55,09	62,93	40,00	47,28	94,67	70,41	44,44	67,41	50,33	59,34
AL2	CB	0,26	0,10	0,16	0,11	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05
	TE	57,00	54,23	42,38	57,61	40,00	66,28	54,03	48,47	73,19	56,69	50,68	57,78
AL3	CB	0,55	0,16	0,15	0,17	0,19	0,12	0,12	0,23	0,12	0,12	0,17	0,10
	TE	51,36	60,27	33,78	64,24	40,00	95,33	66,09	59,79	71,37	62,32	61,54	53,34

AL: Consórcios mantidos com Árape Leve como fonte de carbono; TE: taxa de emulsificação com 24 horas de repouso; CB: Carbono bacteriano.

Tabela 12- Taxa de Emulsificação não aquosa (A%) e aquosa (B%) do Árape Leve pelos consórcios incubados por 30 dias.

Consórcio	Tipo de Emulsificação	Tempo de incubação (dias)											
		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	70
AL1	A	51,47	31,30	37,87	51,01	20,00	30,44	78,08	55,15	44,44	42,57	42,62	41,12
	B	55,00	100,00	90,48	93,33	100,00	100,00	100,00	97,62	100,00	97,53	100,00	100,00
AL2	A	50,49	29,86	38,32	37,44	20,00	48,54	37,02	37,26	66,45	100,00	41,54	37,00
	B	87,88	100,00	82,05	100,00	100,00	100,00	100,00	77,77	100,00	100,00	62,50	83,33
AL3	A	33,57	40,21	25,28	49,78	20,00	74,73	47,31	36,39	50,33	44,00	60,32	37,31
	B	100,00	88,46	67,92	93,33	100,00	100,00	96,29	100,00	100,00	100,00	62,50	60,00

AL: Consórcios mantidos com Árape Leve como fonte de carbono; A: emulsificação da fase não aquosa; B: emulsificação da fase aquosa.

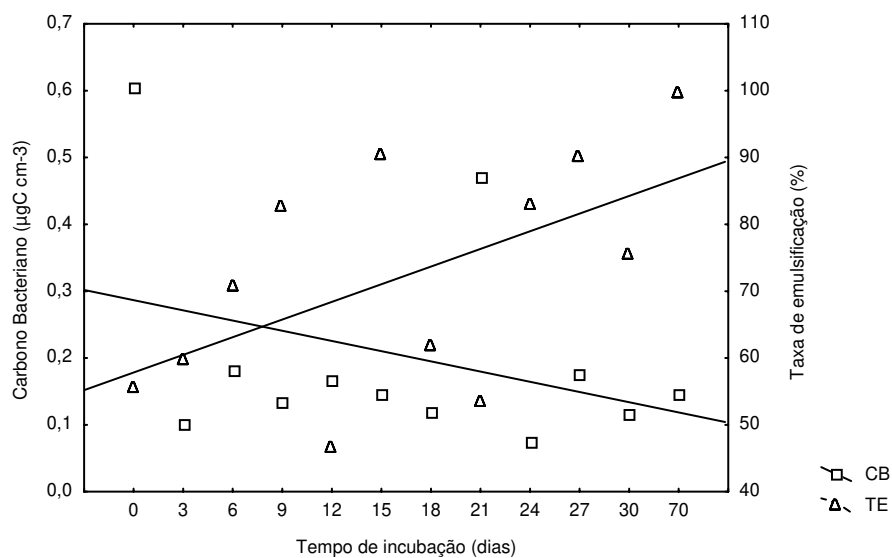


Fig. 1 – Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do consórcio AL1 ao longo de 30 dias.

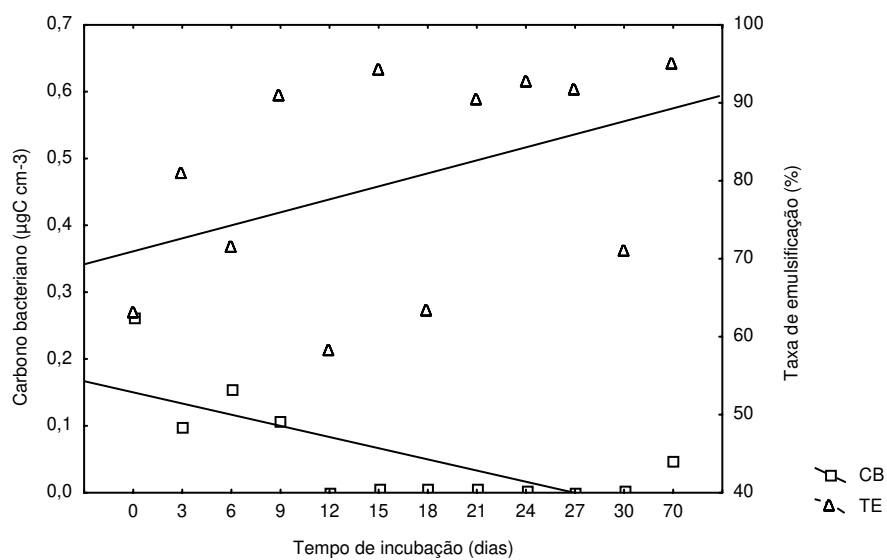


Fig. 2 – Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do consórcio AL2 ao longo de 30 dias.

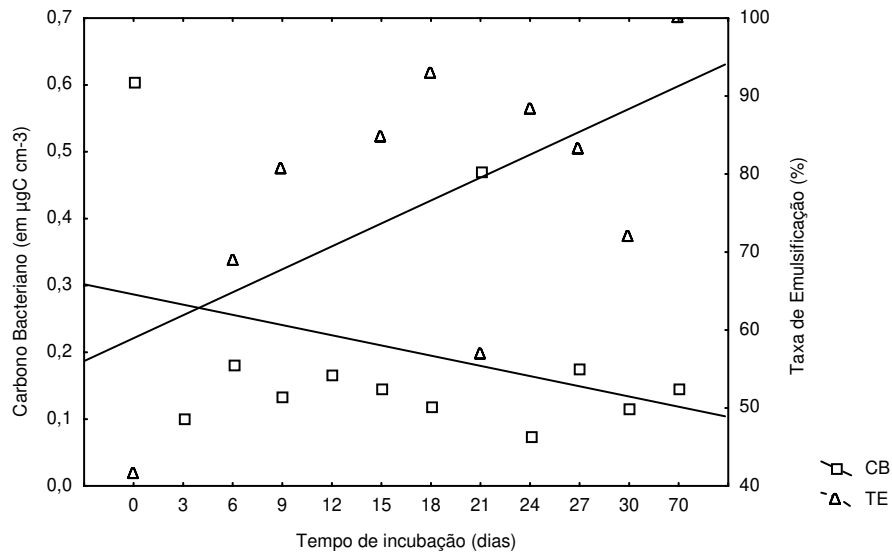


Fig. 3– Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do consórcio AL1 ao longo de 30 dias.

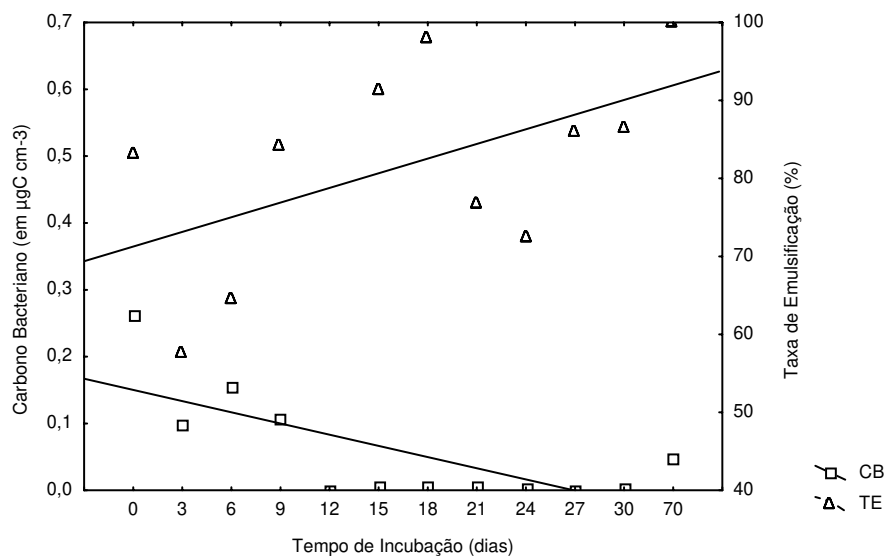


Fig. 4 – Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do consórcio AL 2 ao longo de 30 dias.

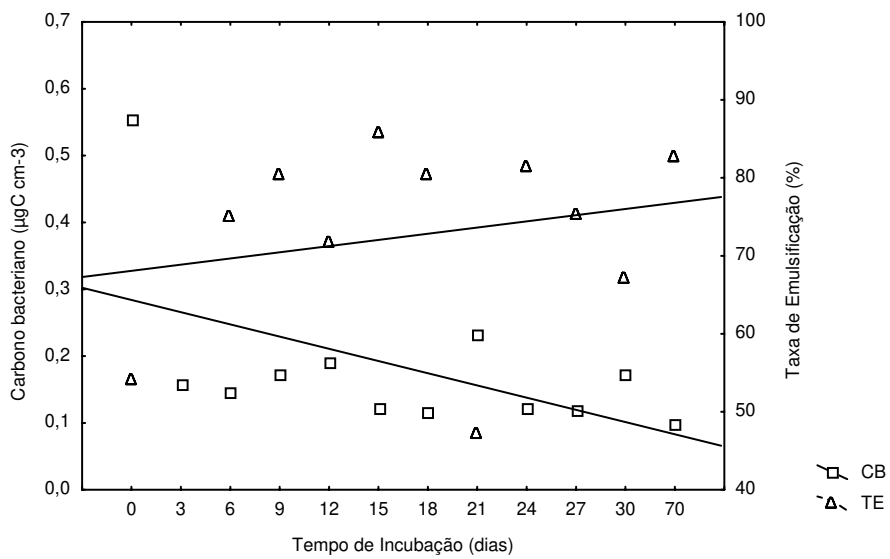


Fig. 5 – Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do consórcio AL 3 ao longo de 30 dias.

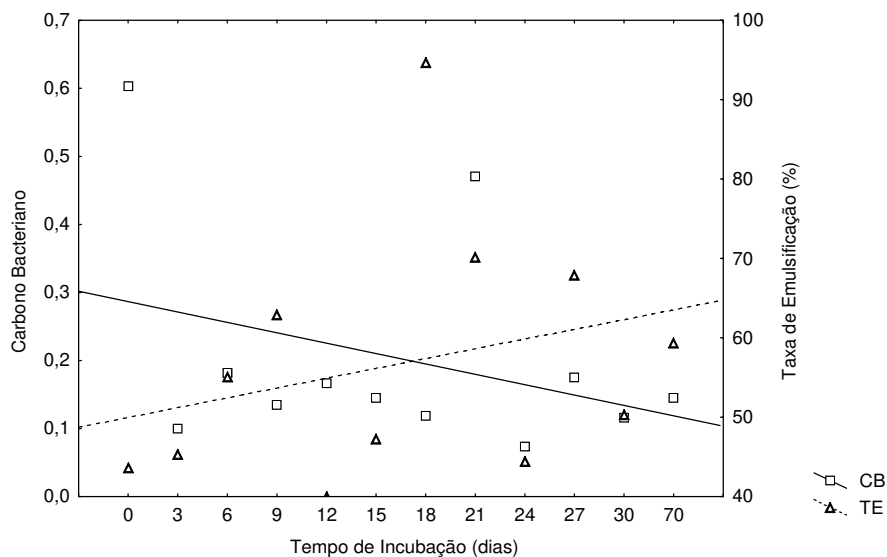


Fig. 6- Taxa de emulsificação (TE%) do Árabe Leve e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do consórcio AL1 ao longo de 30 dias.

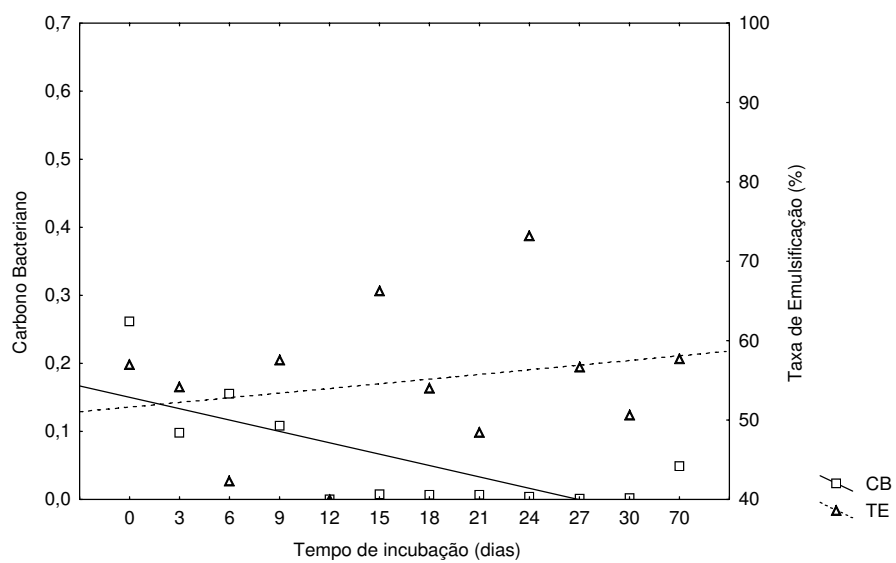


Fig. 7– Taxa de emulsificação (TE%) do Árábe Leve e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do consórcio AL 2 ao longo de 30 dias.

ANEXO II b

Tabelas e Gráficos: Influência Frasco e Oxigênio

Tabela 13- Taxa de emulsificação (TE %) do querosene e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{g C. cm}^{-3}$ pelos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias Erlenmeyer.

Consórcios	Tempo de Incubação (dias)									
	0		6		15		18		30	
	TE (%)	CB	TE (%)	CB	TE (%)	CB	TE (%)	CB	TE (%)	CB
Controle										
AL1	80,77	0,66	79,92	0,12	100,00	0,09	52,18	0,09	95,43	0,08
AL2	64,68	0,27	74,67	0,10	85,56	0,39	79,87	0,07	84,67	0,00
AL3	84,21	0,39	92,54	0,07	88,89	0,04	71,28	0,00	80,67	0,00
Óleo Mineral										
AL1	80,77	0,66	79,92	0,12	68,44	0,09	81,16	0,00	89,33	0,00
AL2	64,68	0,27	99,97	0,10	95,56	0,06	71,09	0,09	77,76	0,00
AL3	84,21	0,39	100,00	0,07	98,96	0,10	83,90	0,09	80,67	0,06

AL: Consórcios mantidos com Ára-be Leve como fonte de carbono; TE: taxa de emulsificação com 24 horas de repouso; CB: .Carbono bacteriano.

Tabela 14 - Taxa de emulsificação (TE%) do querosene e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ pelos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias Wheaton.

Consórcios	Tempo de Incubação (dias)									
	0		6		15		18		30	
	TE (%)	CB	TE (%)	CB	TE (%)	CB	TE (%)	CB	TE (%)	CB
Controle										
AL1	55,04	0,60	70,67	0,18	90,34	0,14	61,79	0,12	75,37	0,12
AL2	62,92	0,26	71,47	0,16	94,20	0,01	63,28	0,00	70,82	0,00
AL3	69,21	0,55	82,78	0,15	90,68	0,12	55,77	0,12	53,14	0,17
Óleo Mineral										
AL1	80,77	0,66	65,84	0,07	70,67	0,00	57,16	0,10	90,24	0,12
AL2	64,68	0,27	63,09	0,00	93,33	0,00	88,71	0,09	90,65	0,00
AL3	84,21	0,39	87,28	0,13	87,39	0,00	74,48	0,04	90,86	0,00

AL: Consórcios mantidos com Ára-be Leve como fonte de carbono; TE: taxa de emulsificação com 24 horas de repouso; CB: .Carbono bacteriano.

Tabela 15- Taxa de emulsificação não aquosa (A) e aquosa (B) do querosene pelos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias em Erlenmeyer.

Consórcios	Tempo de Incubação (dias)									
	0		6		15		18		30	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Controle										
AL1	94,69	60,44	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	34,13	99,21	78,80
AL2	53,66	80,88	74,80	77,08	99,19	67,85	99,19	55,21	97,92	62,90
AL3	84,78	82,80	99,19	85,71	68,25	72,87	92,10	48,02	93,80	66,64
Óleo Mineral										
AL1	94,69	60,44	100,00	100,00	100,00	72,87	100,00	98,41	97,56	79,07
AL2	53,66	80,88	100,00	100,00	94,44	100,00	98,58	36,14	100,00	48,43
AL3	84,78	82,80	100,00	100,00	100,00	95,69	100,00	68,00	98,41	64,93

Tabela 16 - Taxa de emulsificação não aquosa (A) e aquosa (B) do querosene pelos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias em Wheaton.

Consórcios	Tempo de Incubação (dias)									
	0		6		15		18		30	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Controle										
AL1	55,12	55,01	84,98	52,02	96,12	85,60	86,68	46,049	90,97	54,12
AL2	82,78	61,11	85,13	54,4	95,35	95,70	94,94	21,44	72,25	46,04
AL3	62,70	77,16	87,94	78,47	94,96	84,60	69,58	35,56	69,07	84,53
Óleo Mineral										
AL1	53,13	89,80	77,89	98,39	94,70	60,44	94,06	72,22	96,83	93,75
AL2	53,66	80,88	73,61	65,28	96,09	98,92	98,41	76,32	98,48	80,78
AL3	84,78	82,80	100,00	70,83	100,00	73,36	100,00	46,67	100,00	78,04

Tabela 17 - Taxa de emulsificação (TE%) da gasolina e carbono bacteriano (CB) $\mu\text{gC cm}^{-3}$ dos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias em Erlenmeyer.

Consórcios	Tempo de Incubação (dias)									
	0		6		15		18		30	
	TE (%)	CB	TE (%)	CB	TE (%)	CB	TE (%)	CB	TE (%)	CB
Controle										
AL1	67,82	0,66	97,14	0,12	100,00	0,09	100,00	0,09	69,39	0,08
AL2	85,74	0,27	78,38	0,27	85,56	0,39	90,48	0,07	62,43	0,00
AL3	100,00	0,39	100,00	0,073	88,89	0,04	100,00	0,00	99,55	0,00
Óleo Mineral										
AL1	67,82	0,66	96,30	0,12	85,71	0,09	91,74	0,00	57,46	0,00
AL2	85,74	0,27	94,37	0,10	72,41	0,06	100,00	0,09	88,44	0,00
AL3	100,00	0,39	84,76	0,07	78,52	0,10	100,00	0,09	66,50	0,06

Tabela 18- Taxa de emulsificação (TE) da gasolina carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ dos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias Wheaton.

Consórcios	Tempo de Incubação (dias)									
	0		6		15		18		30	
	TE (%)	CB	TE (%)	CB	TE (%)	CB	TE (%)	CB	TE (%)	CB
Controle										
AL1	41,45	0,60	68,79	0,18	84,78	0,15	92,92	0,12	71,94	0,12
AL2	83,15	0,26	64,55	0,16	91,30	0,01	98,08	0,01	86,48	0,00
AL3	53,99	0,55	74,89	0,15	85,72	0,12	80,32	0,12	67,01	0,17
Óleo Mineral										
AL1	67,82	0,66	98,04	0,07	68,80	0,00	96,19	0,10	75,56	0,12
AL2	85,74	0,27	86,99	0,00	68,29	0,00	100,00	0,09	70,43	0,00
AL3	100,00	0,39	93,24	0,13	83,30	0,00	100,00	0,04	89,78	0,00

Tabela 19 - Taxa de emulsificação não aquosa (A) e aquosa (B) da gasolina pelos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias em Erlenmeyer.

Consórcios	Tempo de Incubação (dias)									
	0		6		15		18		30	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Controle										
AL1	36,36	93,80	100,00	95,83	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	44,80
AL2	72,08	92,50	71,88	87,12	99,19	67,85	94,44	91,67	100,00	30,14
AL3	100,00	100,00	96,97	95,83	68,25	72,87	100,00	100,00	100,00	98,37
Óleo Mineral										
AL1	36,36	93,80	100,00	93,33	88,53	83,33	90,55	95,8	87,73	83,60
AL2	72,08	92,50	91,92	95,83	71,72	68,89	100,00	100,00	100,00	79,17
AL3	100,00	100,00	71,88	87,96	85,87	70,83	100,00	100,00	100,00	38,65

Tabela 20 - Taxa de emulsificação não aquosa (A) e aquosa (B) da gasolina pelos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias em Wheaton.

Consórcios	Tempo de Incubação (dias)									
	0		6		15		18		30	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Controle										
AL1	3,16	72,47	79,86	49,34	68,24	96,83	95,24	90,19	88,24	62,61
AL2	82,16	84,00	85,71	65,63	93,55	89,61	97,92	98,33	96,97	85,38
AL3	23,70	78,98	94,76	58,972	77,30	91,75	96,58	66,20	77,40	56,89
Óleo Mineral										
AL1	36,36	93,80	100,00	95,83	100,00	72,66	99,02	89,17	76,19	75,87
AL2	72,08	92,50	66,67	95,83	88,17	53,14	100,00	100,00	90,48	53,79
AL3	100,00	100,00	83,33	100,00	97,92	69,64	100,00	100,00	98,99	83,33

Tabela 21- Taxa de emulsificação (TE) do Árabe Leve e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ dos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias Erlenmeyer.

Consórcios	Tempo de Incubação (dias)									
	0		6		15		18		30	
	TE (%)	CB	TE (%)	CB	TE (%)	CB	TE (%)	CB	TE (%)	CB
Controle										
AL1	55,61	0,66	60,89	0,12	63,11	0,09	74,33	0,09	55,55	0,08
AL2	62,25	0,27	62,68	0,10	62,76	0,39	86,12	0,07	52,17	0,00
AL3	80,32	0,39	53,33	0,07	52,02	0,04	38,91	0,00	42,55	0,00
Óleo Mineral										
AL1	55,61	0,66	59,75	0,12	54,00	0,09	18,76	0,00	50,59	0,00
AL2	62,25	0,27	61,99	0,10	56,53	0,06	20,55	0,09	53,19	0,00
AL3	80,32	0,39	59,18	0,07	51,31	0,10	59,95	0,09	42,69	0,06

Tabela 22- Taxa de emulsificação (TE) do Árabe Leve e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ dos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias em Wheaton.

Consórcios	Tempo de Incubação (dias)									
	0		6		15		18		30	
	TE(%)	CB	TE (%)	CB	TE (%)	CB	TE (%)	CB	TE (%)	CB
Controle										
AL1	43,66	0,60	55,09	0,18	47,28	0,15	94,67	0,12	50,33	0,12
AL2	57,00	0,26	42,38	0,16	66,28	0,01	54,03	0,01	50,68	0,02
AL3	51,36	0,55	33,78	0,15	95,33	0,12	66,09	0,12	61,54	0,17
Óleo Mineral										
AL1	55,61	0,66	60,31	0,07	52,14	0,00	50,61	0,10	51,85	0,12
AL2	62,25	0,27	73,71	0,00	59,36	0,00	84,37	0,09	50,00	0,00
AL3	79,88	0,39	50,36	0,13	49,86	0,00	72,70	0,05	51,28	0,00

Tabela 23 - Taxa de emulsificação não aquosa (A) e aquosa (B) do Árabe Leve pelos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias em Erlenmeyer.

Consórcios	Tempo de Incubação (dias)									
	0		6		15		18		30	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Controle										
AL1	29,67	100,00	37,18	93,33	37,78	100,00	55,37	85,19	55,56	100,00
AL2	42,73	100,00	55,93	95,00	39,26	100,00	78,33	95,06	52,17	100,00
AL3	67,03	100,00	52,96	100,00	35,04	88,89	38,53	60,04	42,55	100,00
Óleo Mineral										
AL1	29,67	100,00	27,54	100,00	39,63	100,00	17,21	23,69	41,23	100,00
AL2	42,73	100,00	42,89	100,00	35,04	93,33	57,83	61,30	53,20	100,00
AL3	67,03	100,00	52,97	100,00	32,38	91,24	74,69	76,10	27,89	83,57

Tabela 24 - Taxa de emulsificação não aquosa (A) e aquosa (B) do Árabe Leve pelos consórcios incubados por 0, 6, 15, 18 e 30 dias em Wheaton.

Consórcios	Tempo de Incubação (dias)									
	0		6		15		18		30	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Controle										
AL1	51,47	55,00	37,87	90,48	30,44	100,00	78,08	100,00	42,62	100,00
AL2	50,49	87,88	38,32	82,05	48,54	100	37,02	100	41,54	62,50
AL3	33,57	100,00	25,28	67,92	74,73	100,00	47,31	96,29	60,32	62,50
Óleo Mineral										
AL1	29,67	100	40,60	100	17,68	100	38,82	60,63	40,74	100,00
AL2	42,73	100	50,09	100	37,30	100	77,78	57,47	50,00	100,00
AL3	67,03	100	45,24	100	28,52	93,33	57,62	81,33	49,45	93,33

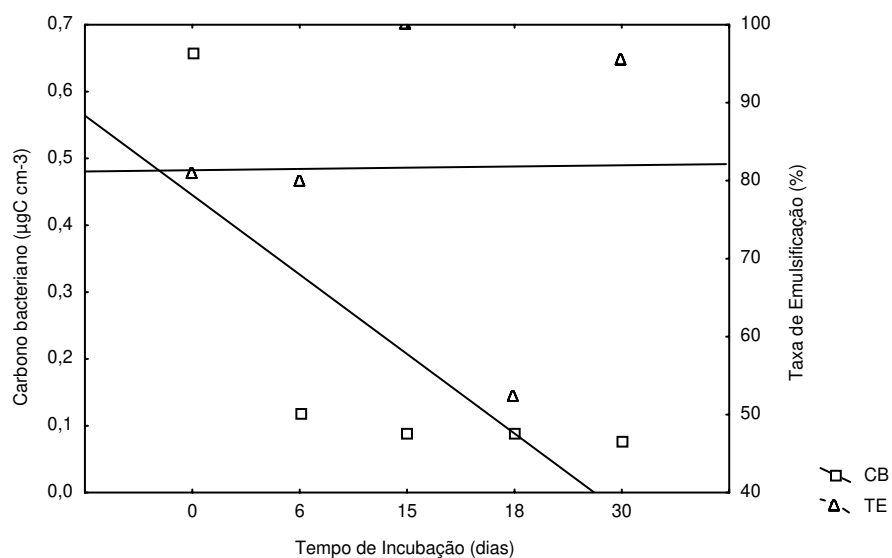


Fig. 8- Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 1 controle em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação.

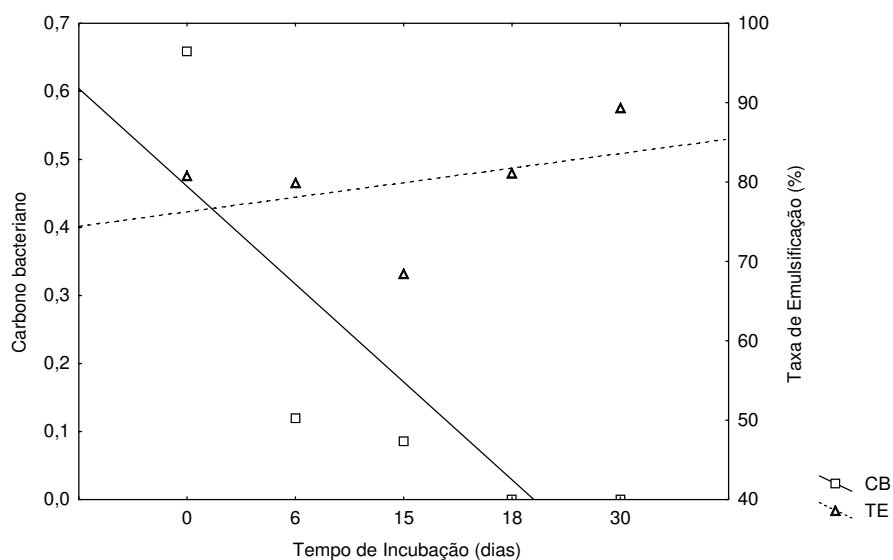


Fig. 9- Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 1 com óleo mineral em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação.

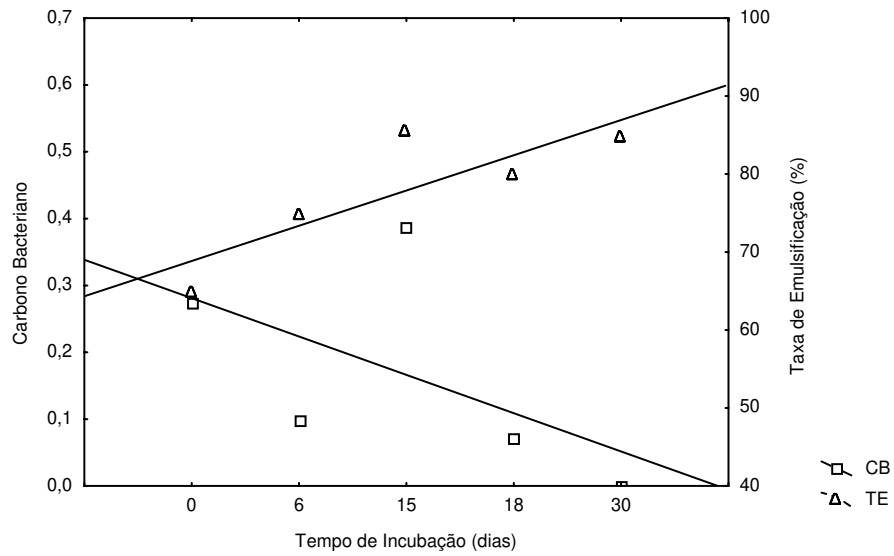


Fig. 10 - Taxa de emulsificação do querosene (TE) e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 2 controle em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação.

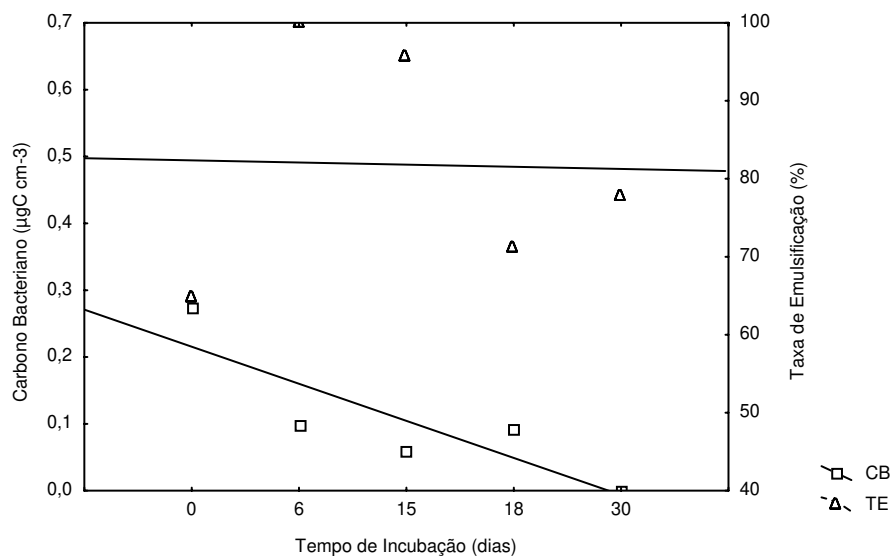


Fig. 11- Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 2 com óleo em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação.

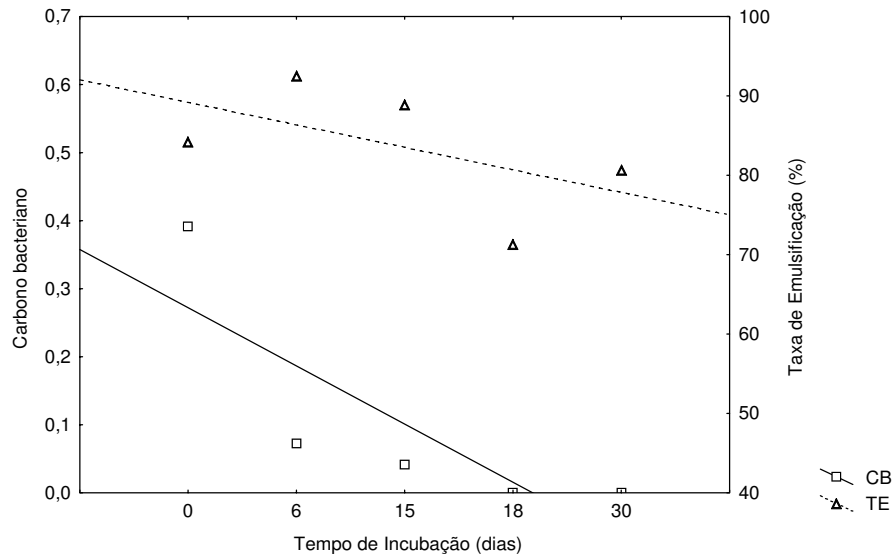


Fig. 12- Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 3 controle em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação.

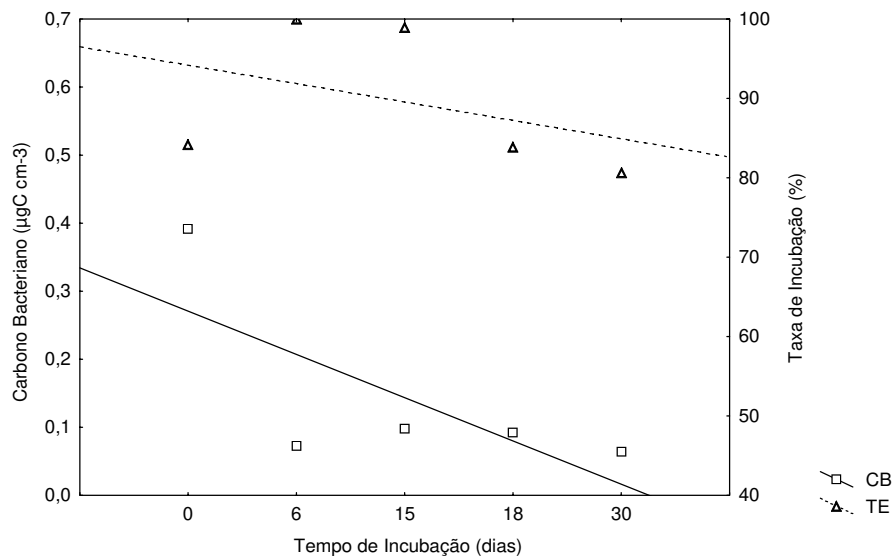


Fig. 13- Taxa de emulsificação (TE%) do querosene e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 3 com óleo mineral em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação.

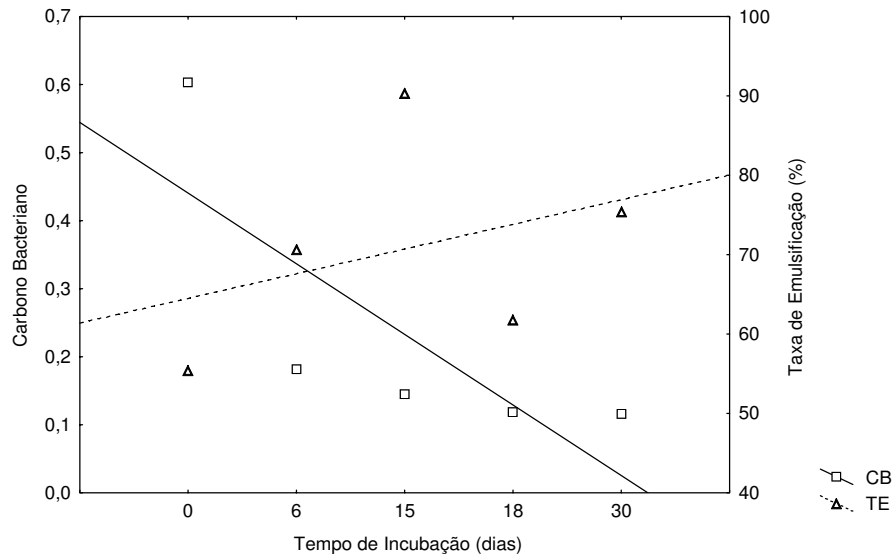


Fig. 14- Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) do AL 1 controle ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton.

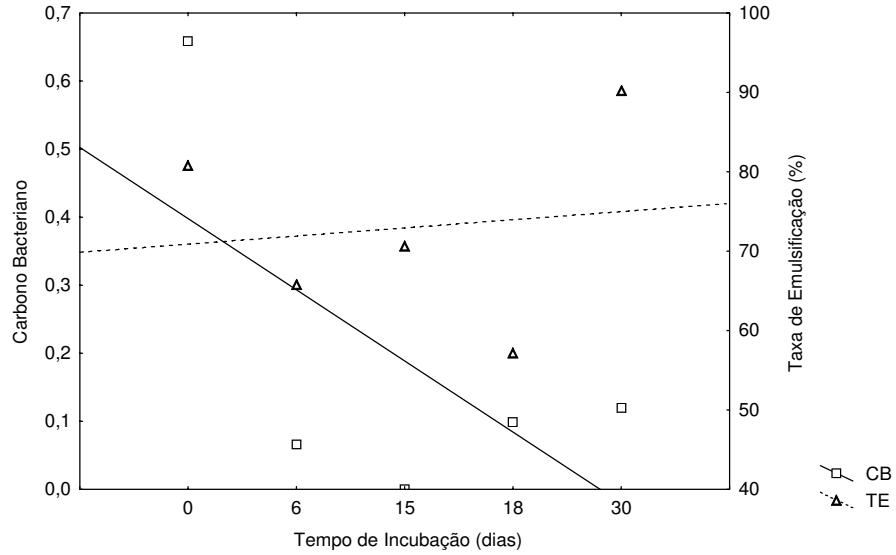


Fig. 15- Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) do AL 1 com óleo mineral ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton.

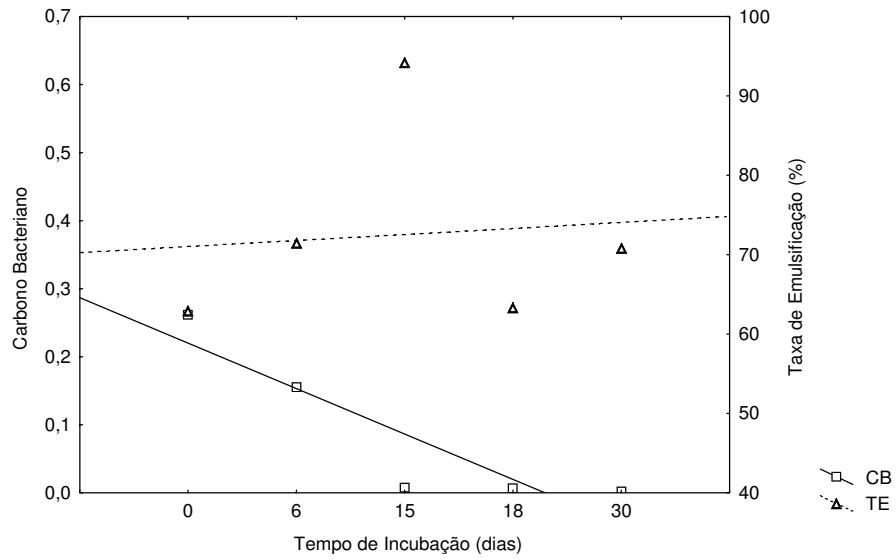


Fig. 16- Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) do AL 2 controle ao longo de 30 dias de incubação em Wheaton.

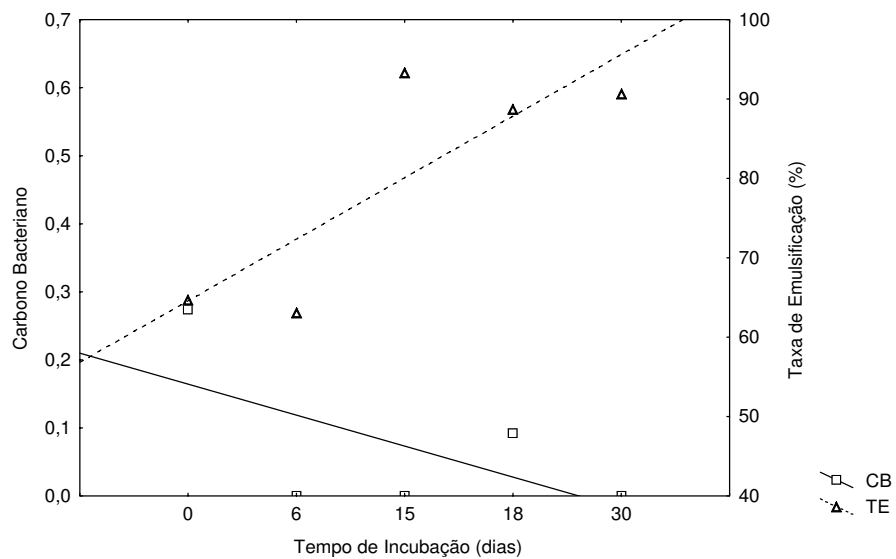


Fig. 17- Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) do AL 2 com óleo mineral ao longo de 30 dias de incubação em Wheaton.

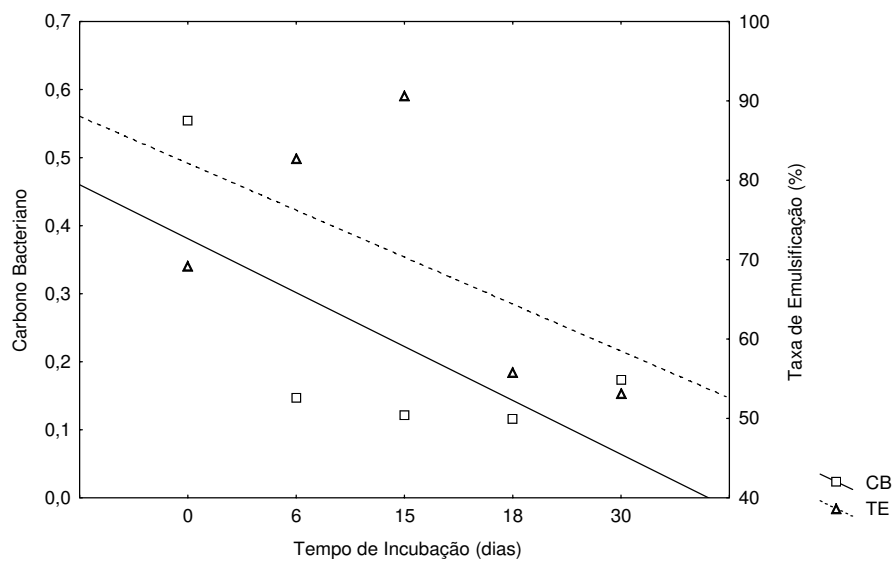


Fig. 18- Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) do AL 3 controle ao longo de 30 dias de incubação em Wheaton.

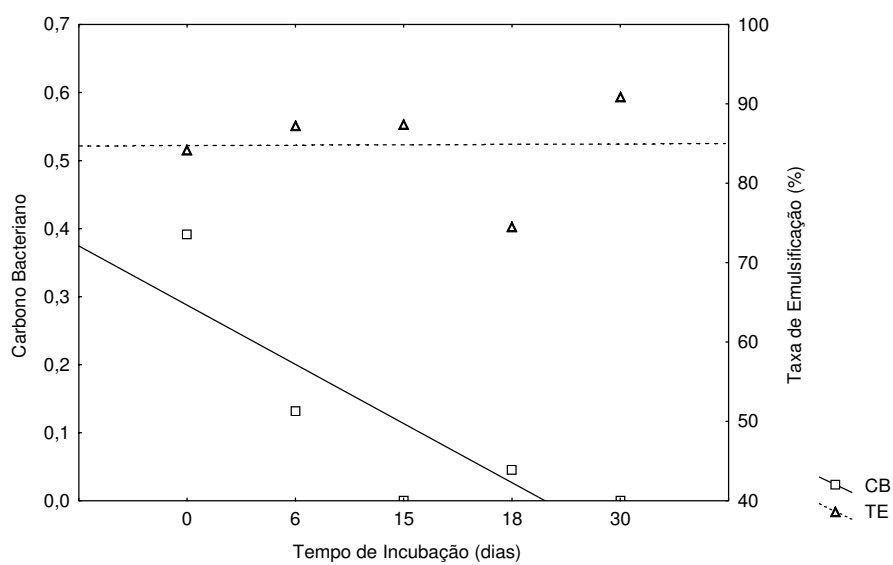


Fig. 19- Taxa de emulsificação (TE) do querosene e carbono bacteriano (CB) do AL 3 com óleo mineral ao longo de 30 dias de incubação em Wheaton.

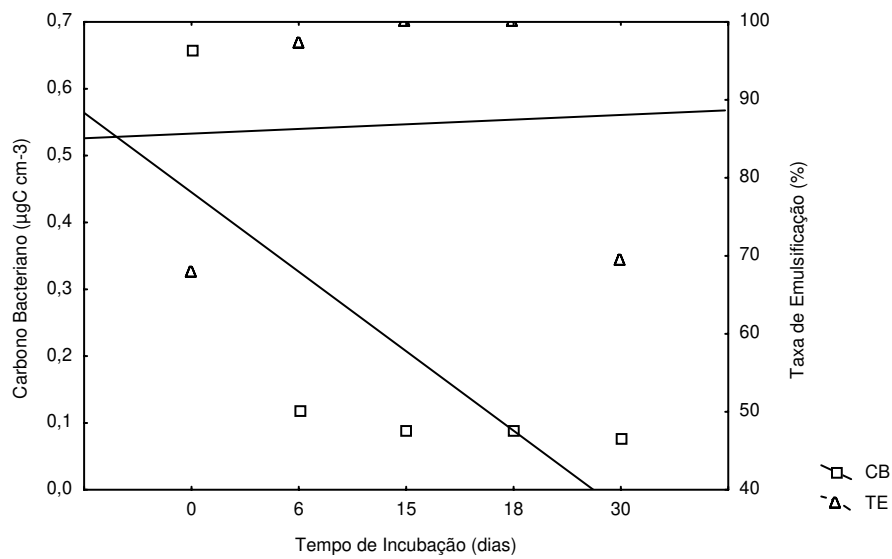


Fig. 20 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 1 controle em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação.

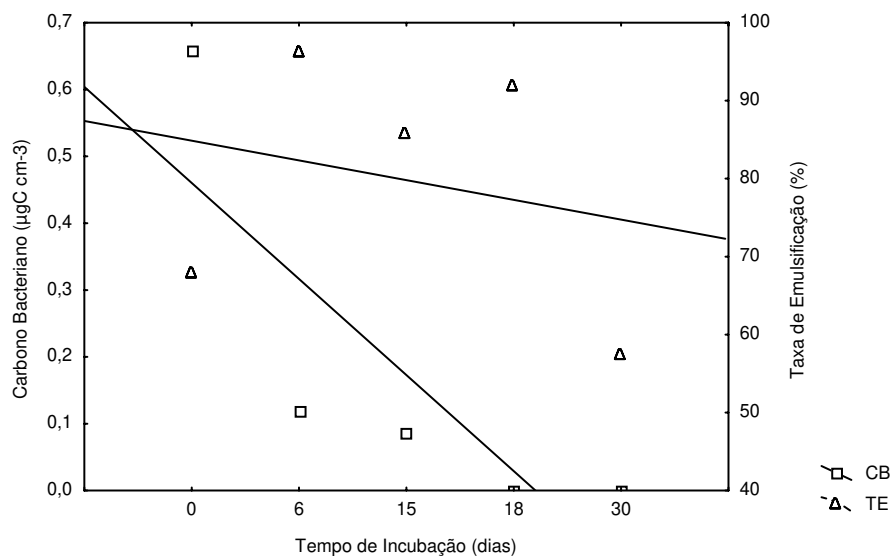


Fig. 21 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 1 com óleo mineral em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação.

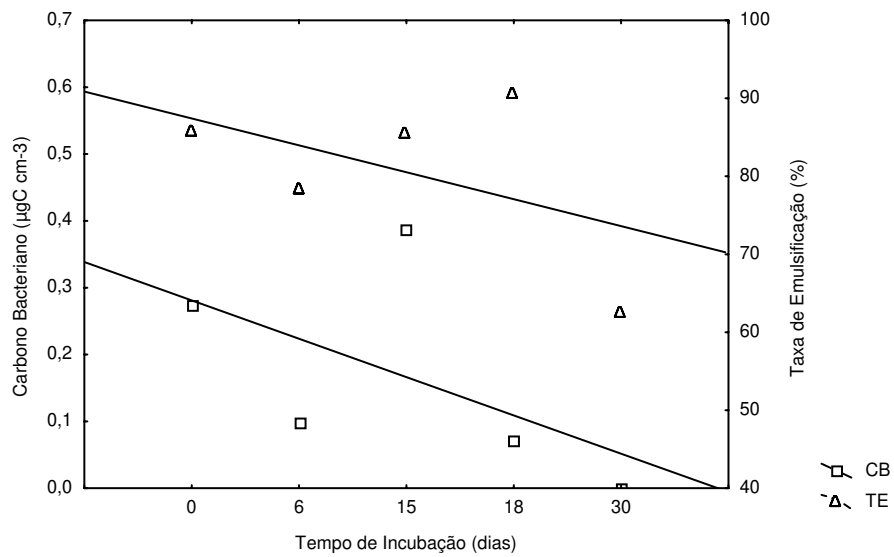


Fig. 22 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 2 controle em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação.

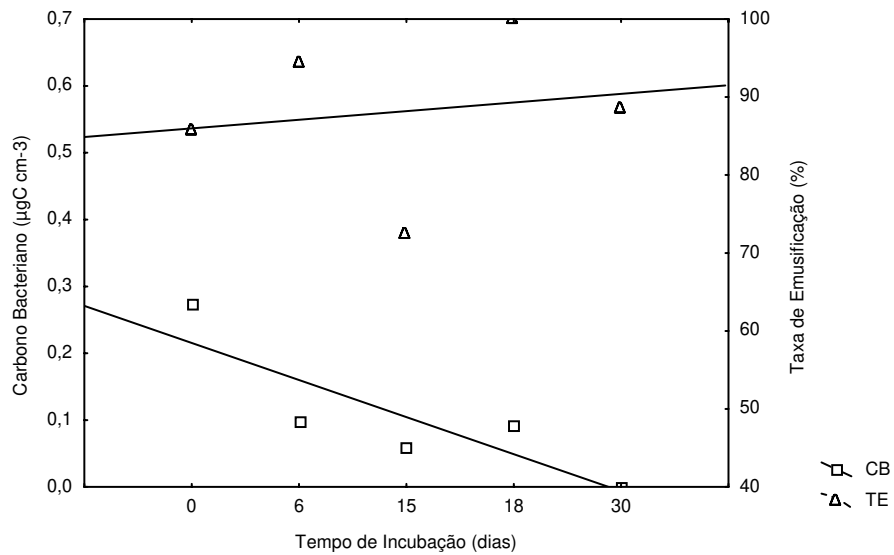


Fig. 23 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 2 com óleo mineral em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação.

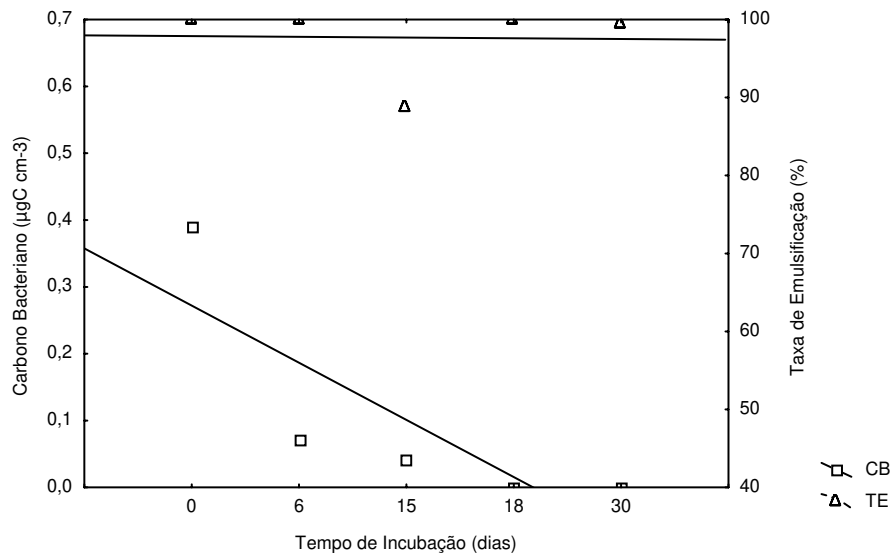


Fig. 24 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 3 com controle em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação.

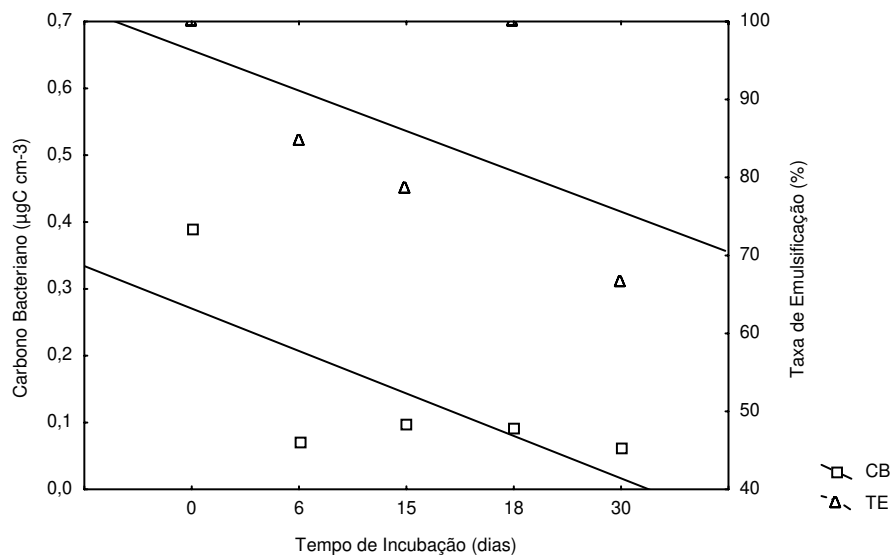


Fig. 25 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 3 com óleo mineral em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação.

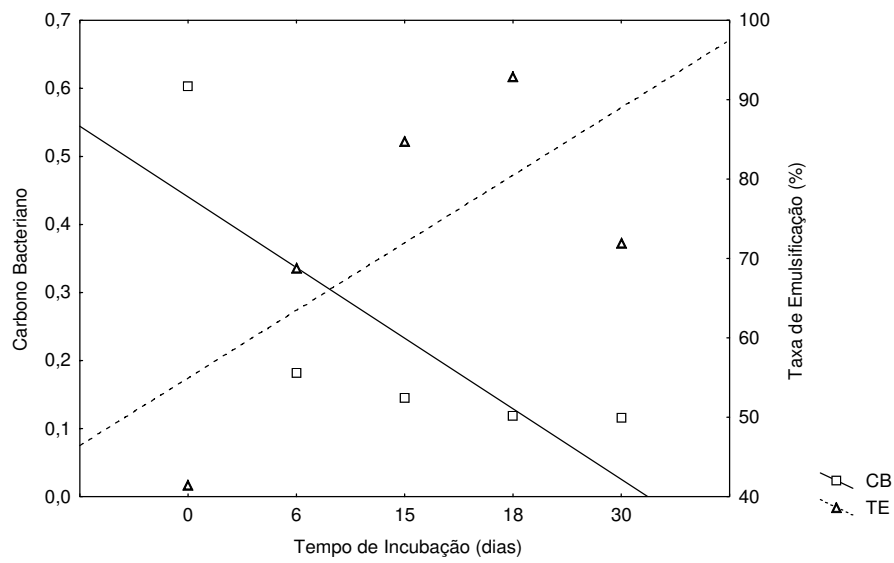


Fig. 26 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) do AL 1 controle ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton.

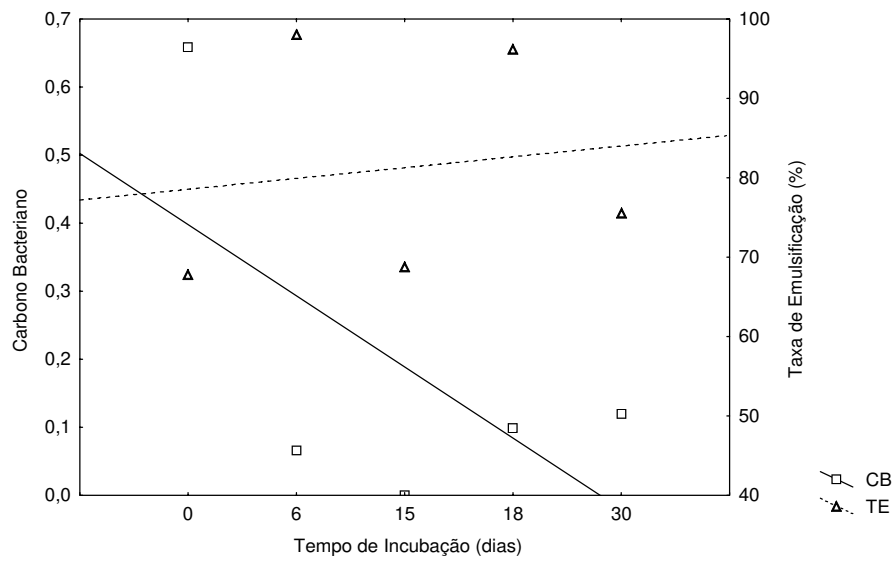


Fig. 27 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) do AL 1 com óleo mineral ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton.

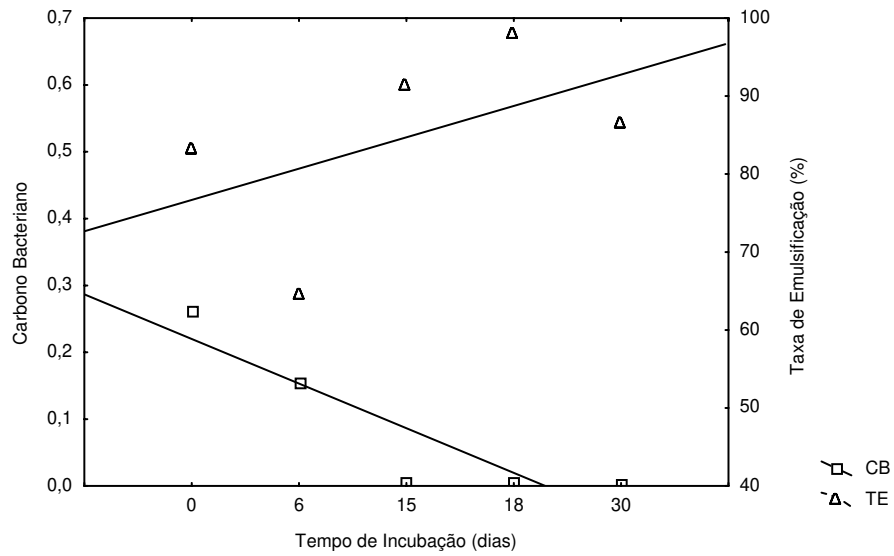


Fig. 28 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) do AL 2 controle ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton.

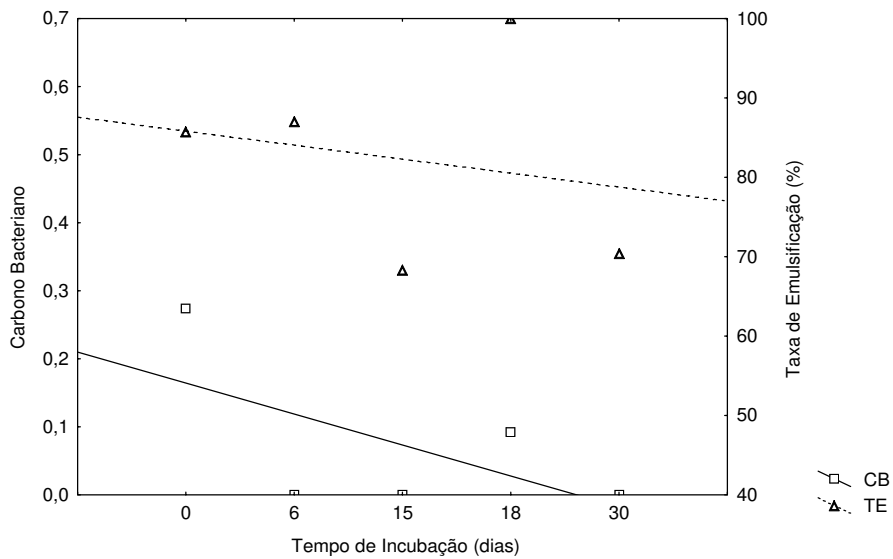


Fig. 29 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) do AL 2 com óleo mineral ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton.

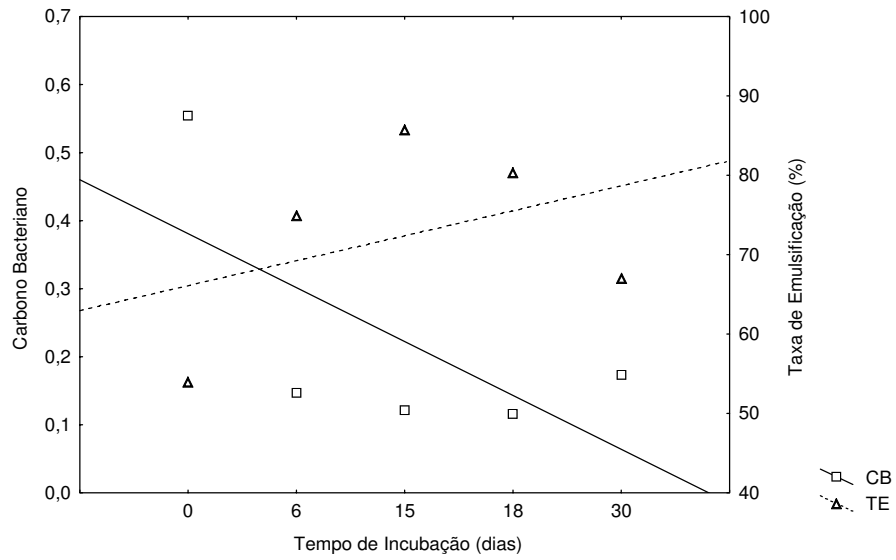


Fig. 30 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) do AL 3 controle mineral ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton.

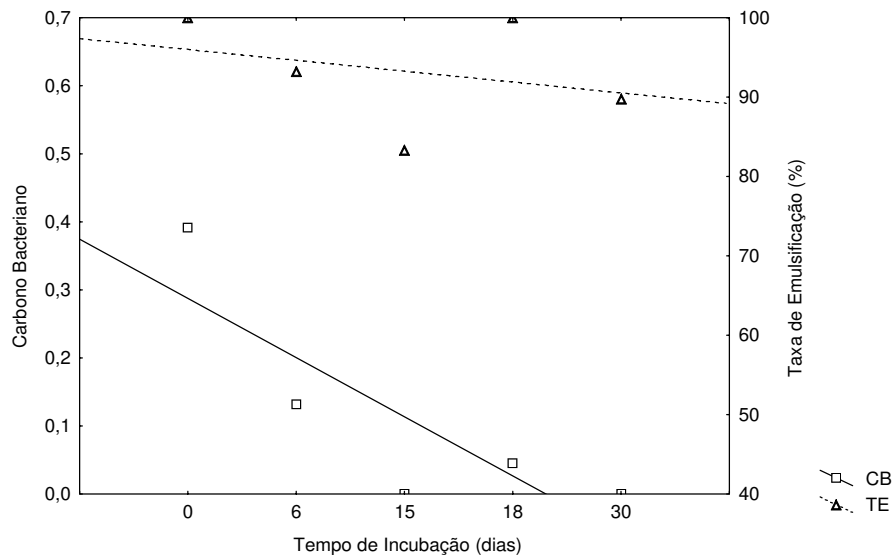


Fig. 31 - Taxa de emulsificação (TE) da gasolina e carbono bacteriano (CB) do AL 3 com óleo mineral ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton.

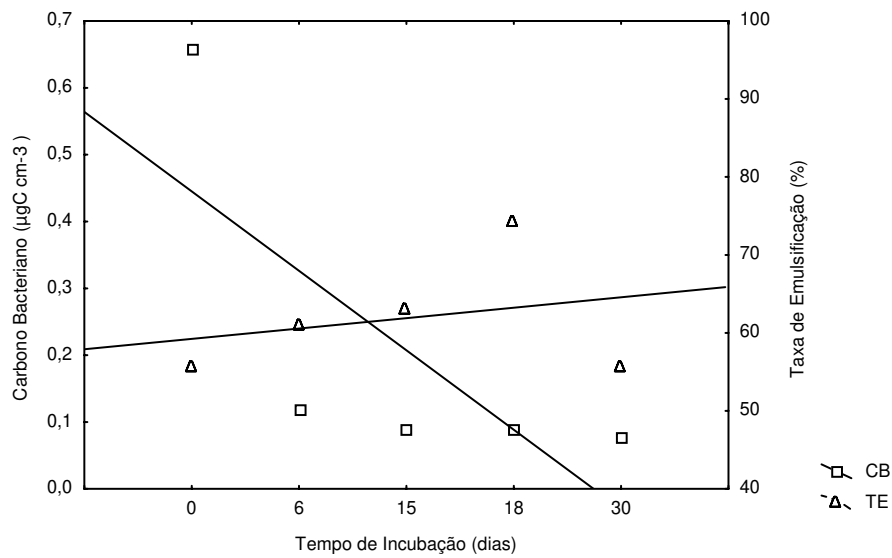


Fig. 32 - Taxa de emulsificação do Árabe Leve (TE) e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 1 controle em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação.

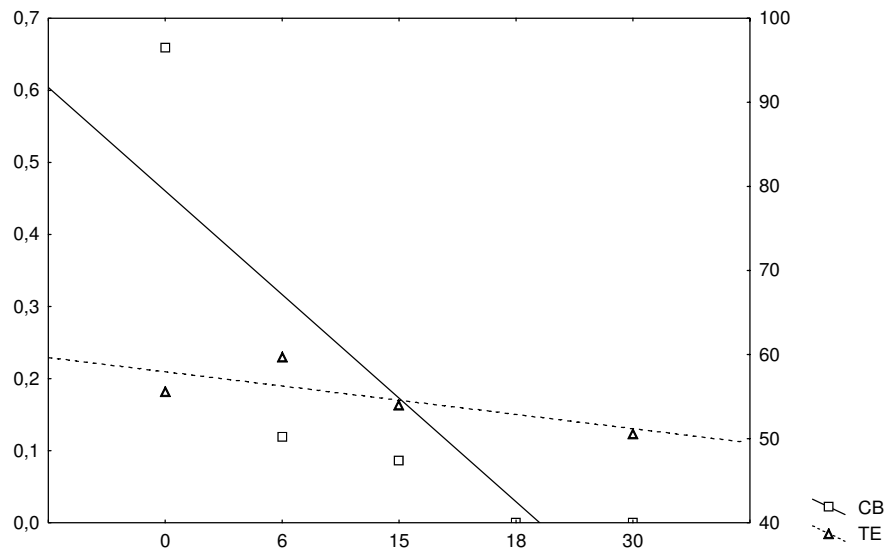


Fig. 33- Taxa de emulsificação (TE) do Árabe Leve e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 1 com óleo mineral em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação.

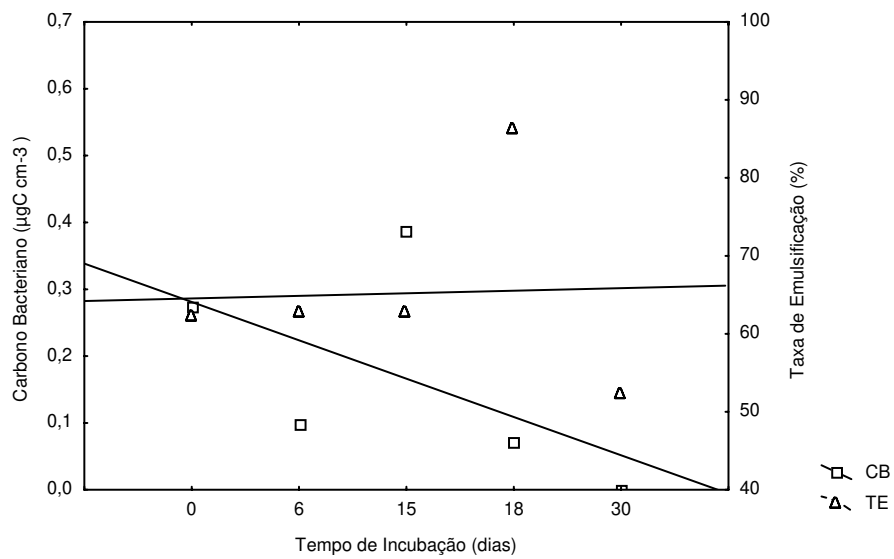


Fig. 34 - Taxa de emulsificação do Árabes Leve (TE) e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 2 controle em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação.

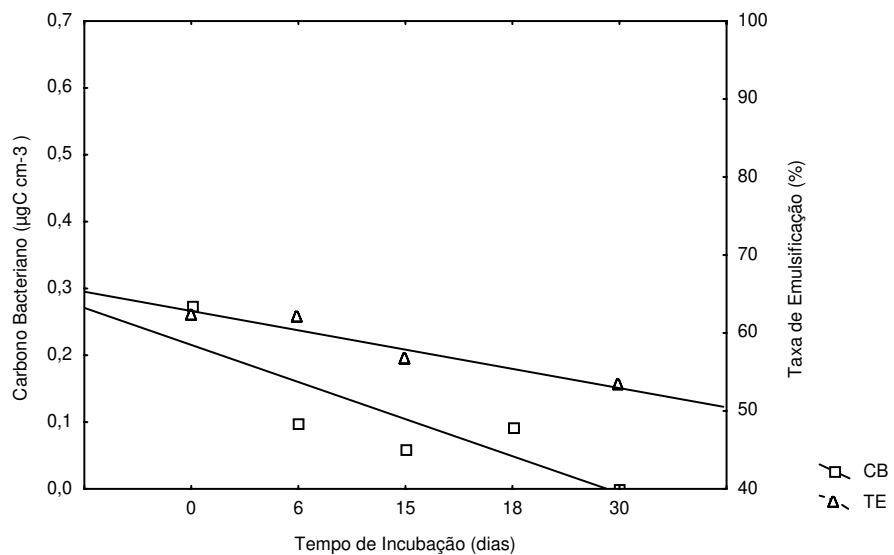


Fig. 35- Taxa de emulsificação do Árabes Leve (TE) e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 2 com óleo mineral em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação.

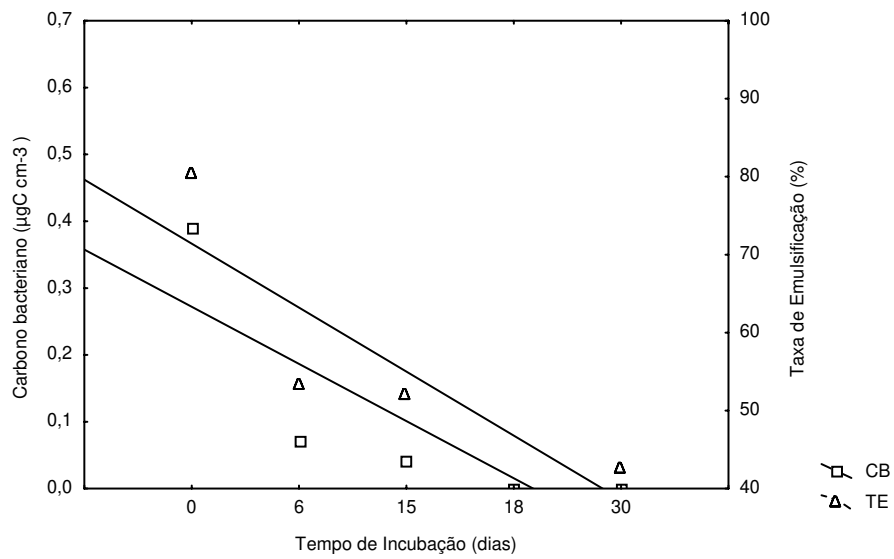


Fig. 36- Taxa de emulsificação do Árábe Leve (TE) e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 3 controle em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação.

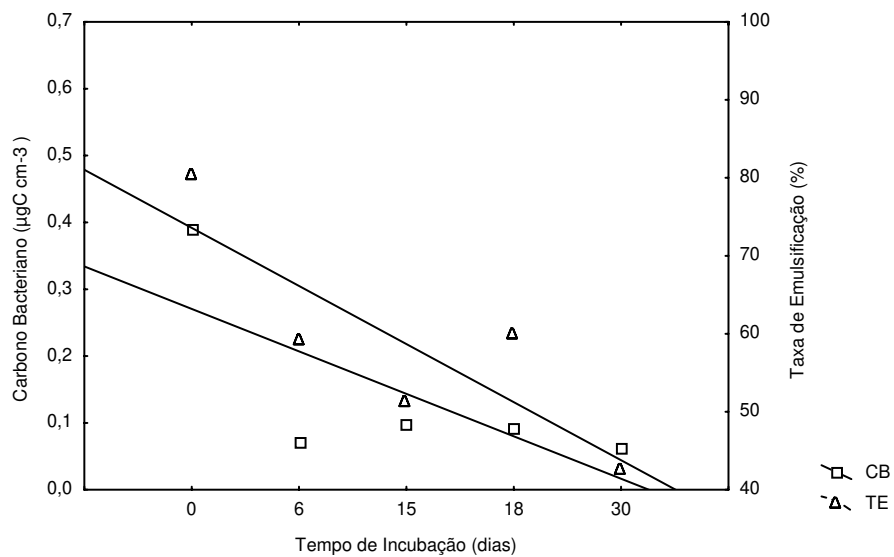


Fig. 37- Taxa de emulsificação (TE) do Árábe Leve e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 3 com óleo mineral em Erlenmeyer ao longo de 30 dias de incubação.

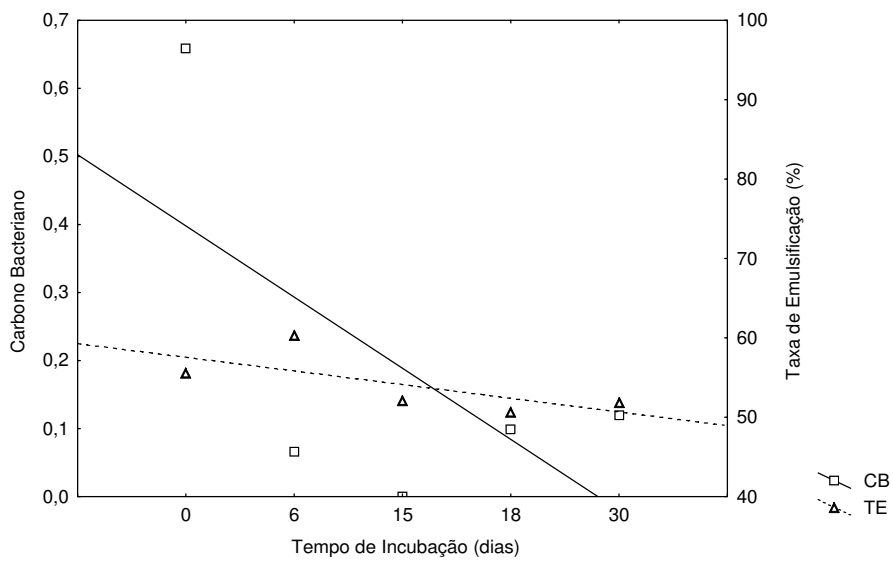


Fig. 38- Taxa de emulsificação (TE) do Árape Leve e carbono bacteriano (CB) do AL 1 em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ com óleo mineral ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton.

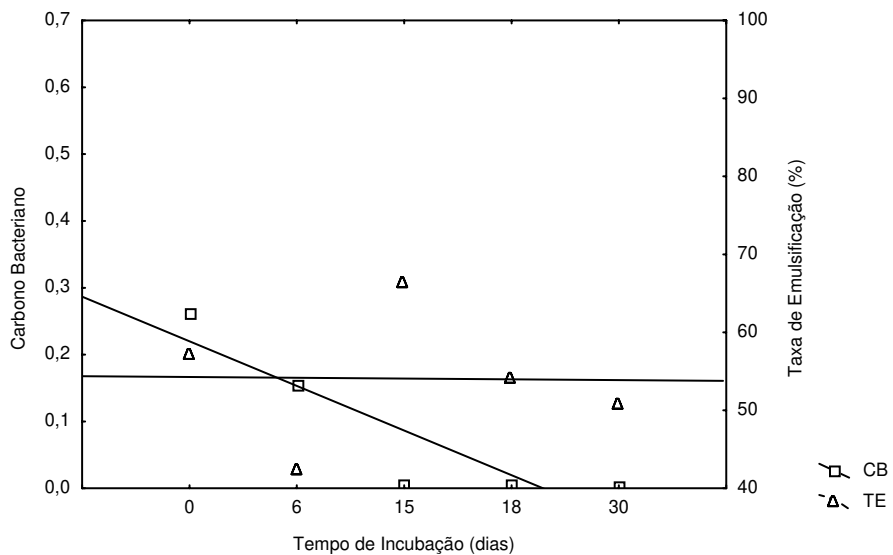


Fig. 39- Taxa de emulsificação (TE) do Árape Leve e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 2 controle ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton.

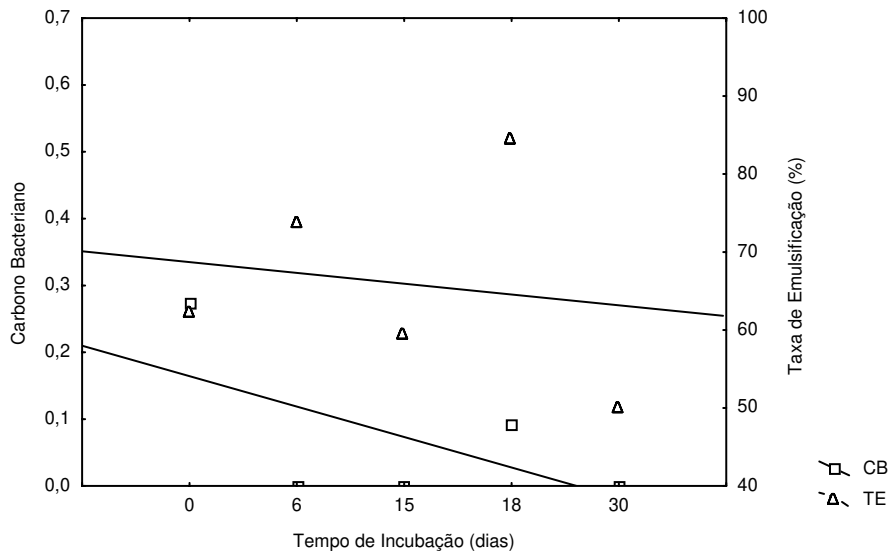


Fig. 40- Taxa de emulsificação (TE) do Árábe Leve e carbono bacteriano (CB) em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ do AL 2 com óleo mineral ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton.

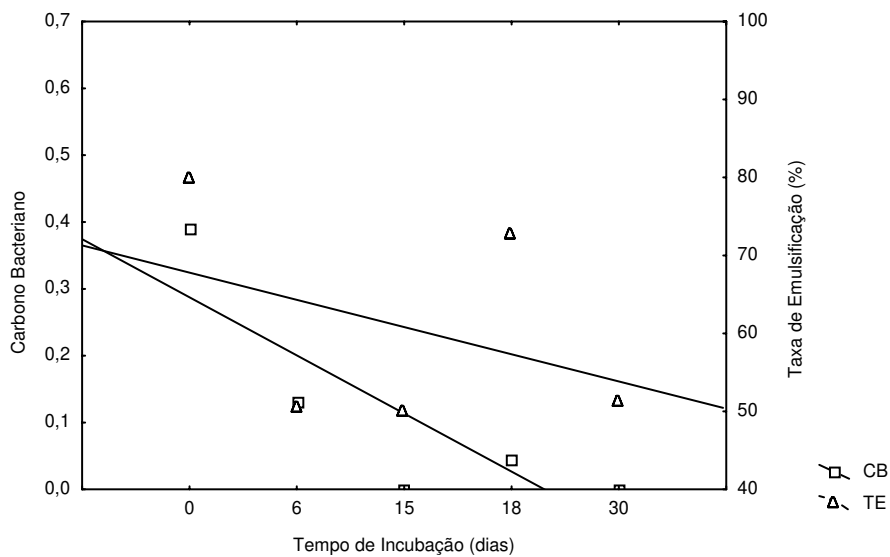


Fig. 41 - Taxa de emulsificação (TE) do Árábe Leve e carbono bacteriano (CB) do AL 3 em $\mu\text{gC cm}^{-3}$ com óleo mineral ao longo de 30 dias de incubação em frasco Wheaton.

ANEXO III

Tabelas: Eficiência do surfactante

Tabela 25 – Densidade (hg/m^3) dos consórcios utilizados para medida de tensão superficial, incubados por 15 dias em meio de cultura com 25% e 50% de água do mar.

Amostras	Densidade (hg/m^3)	
	25% AM	50% AM
AL1	1,0108	1,0120
AL2	1,0110	1,0124
AL3	1,0105	1,0116
Controle	1,0095	1,0103

*Controle: meio de cultura sem crescimento bacteriano; AM: Concentração de água do mar utilizada para os ensaios.

Tabela 26 - Tensão de Superfície (mN/m) dos consórcios AL1, 2 e 3 incubados por 15 dias em meio de cultura com 25% ou 50% de água do mar*.

Amostras	Tensão de Superfície (mN/m)	
	AM 25%	AM 50%
AL1	63,62	66,66
AL2	64,39	63,22
AL3	65,22	59,99
Controle	71,27	71,04

*Controle: meio de cultura sem crescimento bacteriano; AM: Concentração de água do mar utilizada para os ensaios.

ANEXO IV

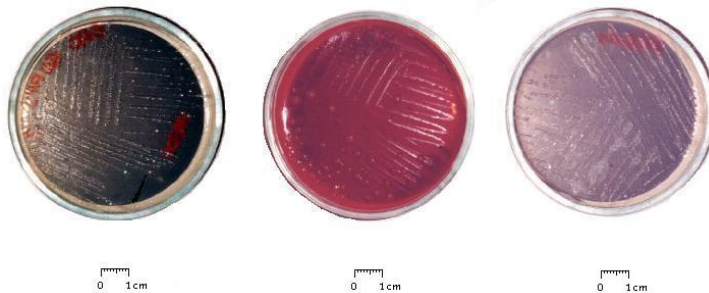
Ilustrações



COLETA DE SEDIMENTO



SELEÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE BIOMASSA BACTERIANA HIDROCARBONOCLÁSTICA



ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE CONSÓRCIOS BACTERIANOS HIDROCARBONOCLÁSTICOS

Fig. 42- Fluxograma da metodologia empregada para isolamento de consórcios hidrocarbonoclasticos produtores de biossurfactante.

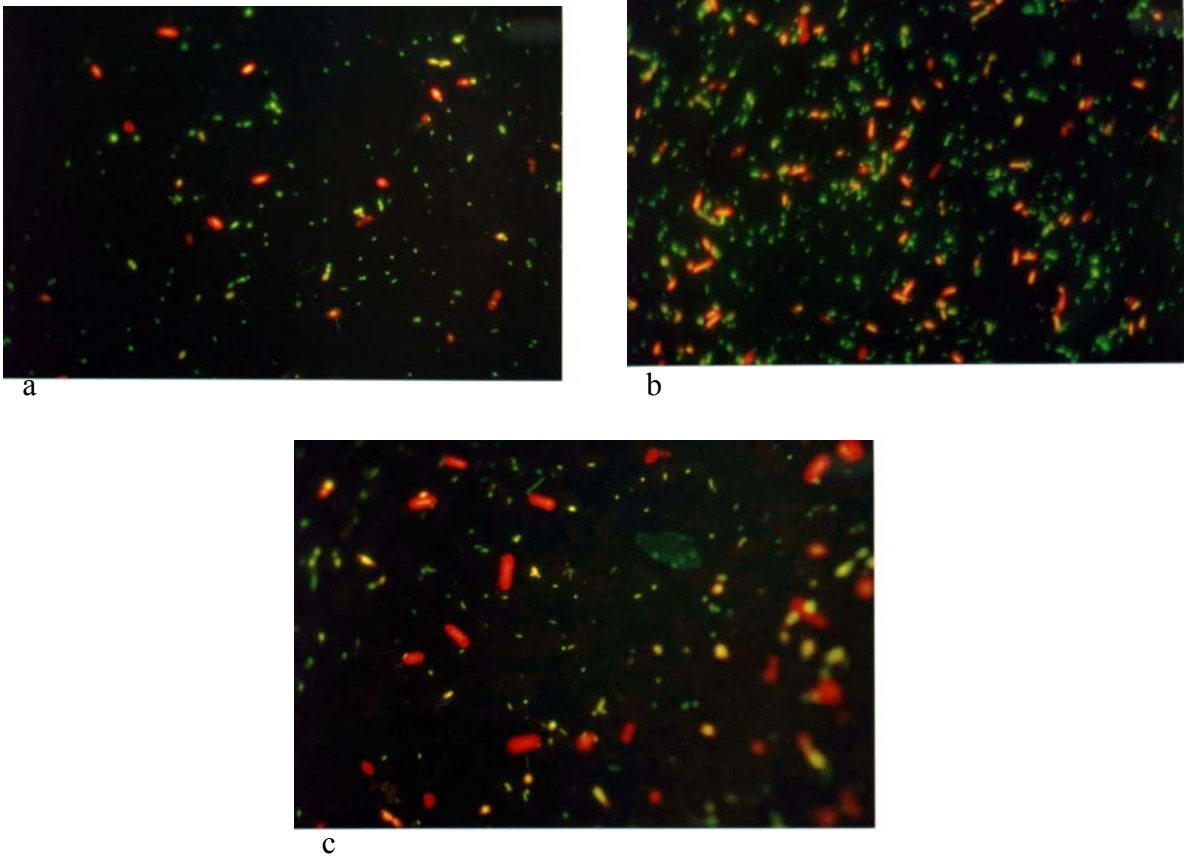


Fig. 43- Microscopia de epifluorescência com fluorocromo vermelho de acridina do AL1 com 24h (a), 48h (b) e 72h (c), em aumento 1.000 x. Estruturas coradas em vermelho representam as cápsulas.

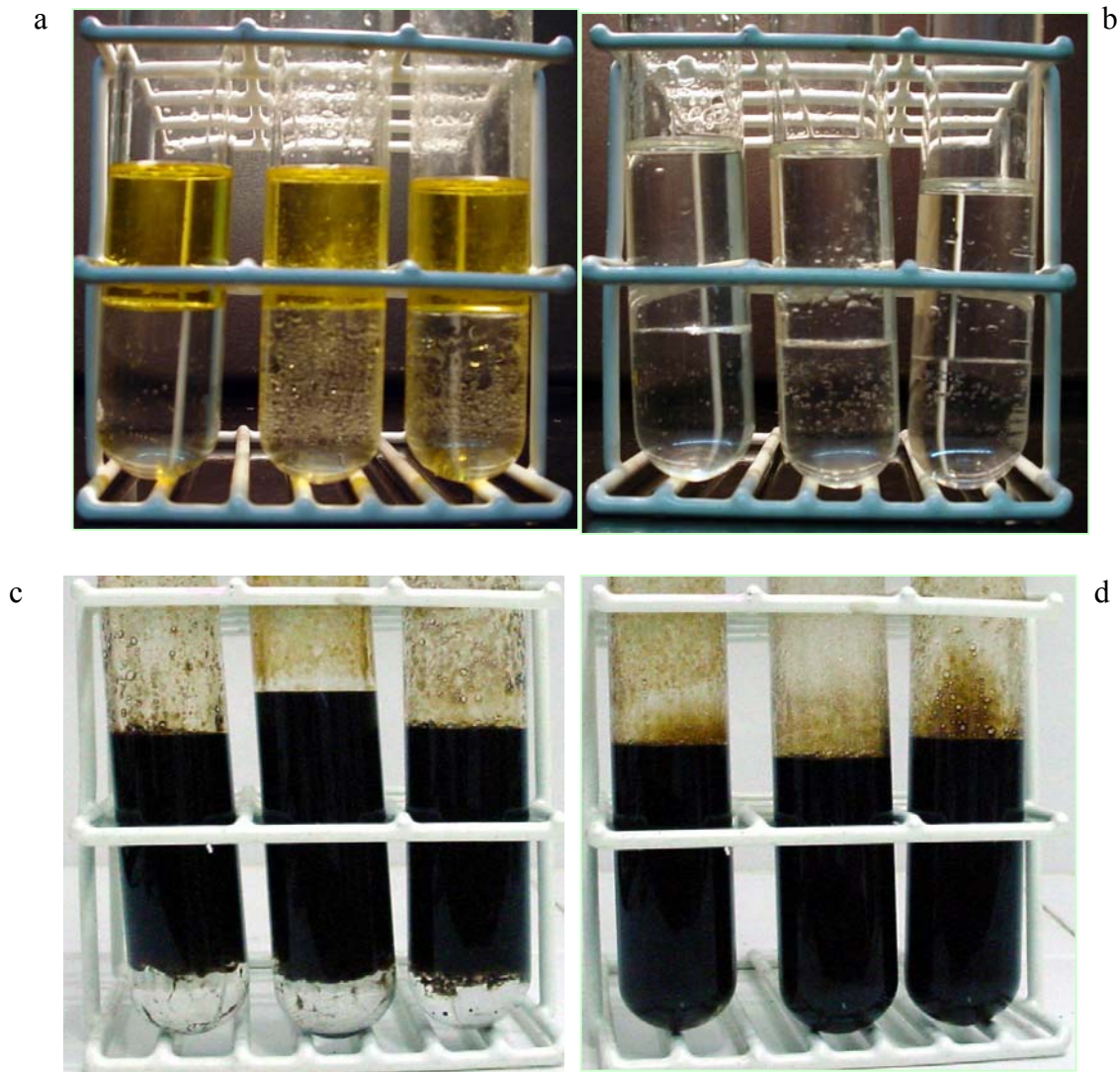


Fig. 44 – Ensaio TE. Tubos contendo meio de cultura com surfactante produzido por consórcio bacteriano hidrocarbonoclástico em presença de derivados do petróleo: (a) gasolina, (b) querosene e (c, d) Árabes Leves, mostrando a emulsificação dos compostos hidrofóbicos. Notar o desaparecimento da fase aquosa no (d).

ANEXO V

Siglas e abreviaturas empregadas

- A – Emulsificação da fase não aquosa
- a/o – emulsificação água em óleo
- AB – Ácido benzóico
- AL1 – Consórcio 1 mantido em Árabe Leve
- AL1 25 – Consórcio AL1 em meio de cultura com água do mar a 25%
- AL1 50 - Consórcio AL1 em meio de cultura com água do mar a 50%
- AL2 – Consórcio 2 mantido em Árabe Leve
- AL2 25 - Consórcio AL2 em meio de cultura com água do mar a 25%
- AL2 50 - Consórcio AL2 em meio de cultura com água do mar a 50%
- AL3 – Consórcio 3 mantido em Árabe Leve
- AL3 25 - Consórcio AL3 em meio de cultura com água do mar a 25%
- AL3 50 - Consórcio AL3 em meio de cultura com água do mar a 50%
- AM – água do mar
- APA – Área de Proteção Ambiental
- ASP – Ácido Aspártico
- B – Emulsificação de fase aquosa
- C25 – Controle do meio de cultura com água do mar a 25%
- C50 - Controle do meio de cultura com água do mar a 50%
- CB – Carbono bacteriano
- CIT – Citrato de sódio
- GAL – Galactose
- GLI – Glicose
- HPA – Hidrocarboneto Policíclico Aromático
- LAC – Lactose
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
- o/a – emulsificação óleo em água
- OXA – Oxalato de amônio
- S1 – Consórcio 1 mantido em sacarose
- S2 – Consórcio 2 mantido em sacarose
- S3 – Consórcio 3 mantido em sacarose
- TE – Taxa de emulsificação
- TS – Tensão de Superfície