



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
MESTRADO EM SISTEMAS AQUÁTICOS TROPICAIS

RITA MARIA COSTA WETLER

**PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS RESPONSÁVEIS PELA
DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS DE PETRÓLEO NO SEDIMENTO
DE UM MANGUEZAL LOCALIZADO NO SUL DA BAHIA (BRASIL)**

ILHÉUS – BA

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

RITA MARIA COSTA WETLER

**PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS RESPONSÁVEIS PELA
DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS DE PETRÓLEO NO SEDIMENTO
DE UM MANGUEZAL LOCALIZADO NO SUL DA BAHIA (BRASIL)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ecologia

Área de concentração: Sistemas Aquáticos Tropicais

Orientadora: Prof^a Dr^a Rachel Passos Rezende

**ILHÉUS – BA
2006**

RITA MARIA COSTA WETLER

**PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS RESPONSÁVEIS PELA DEGRADAÇÃO
DE COMPOSTOS DE PETRÓLEO NO SEDIMENTO DE UM MANGUEZAL
LOCALIZADO NO SUL DA BAHIA (BRASIL)**

Ilhéus, 22 de agosto de 2006.

Prof. ^a Dr^a Rachel Passos Rezende
UESC
(Orientadora)

Prof. Dr. Eduardo Gross
UESC

Prof. Dr. Alexandre Soares Rosado
UFRJ



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM
SISTEMAS AQUÁTICOS TROPICAIS
MESTRADO ACADÊMICO NA ÁREA DE ECOLOGIA**

ATA DE DEFESA PÚBLICA Nº 003
DISSERTAÇÃO DE RITA MARIA COSTA WETLER
NO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS AQUÁTICOS TROPICAIS
stricto sensu – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ECOLOGIA – NÍVEL: MESTRADO
ACADÊMICO

Aos vinte e dois dias do mês de agosto do ano de dois mil e seis, às 09h00, reuniu-se na Sala 115 do Programa de Pós-Graduação em Sistemas Aquáticos Tropicais, localizada no 1º andar do Pavilhão do Juizado Modelo da Universidade Estadual de Santa Cruz, a Comissão Examinadora, composta pelos Doutores **Alexandre Soares Rosado** e **Eduardo Gross** examinadores, e presidida por mim, **Rachel Passos Rezende**, orientadora, para julgar o trabalho intitulado “**Prospecção de microorganismos responsáveis pela biorremediação de petróleo em um manguezal localizado no município de Una-Bahia-Brasil**” de autoria de **Rita Maria Costa Wetler**. Após arguição e discussão, a banca examinou, analisou e avaliou o referido trabalho, chegando a conclusão que este está **aprovado**. Nada mais havendo a ser tratado, esta Comissão Examinadora encerrou a Reunião da qual eu, Presidente desta Banca, lavrei a presente ATA que, após lida e aprovada vai assinada pelos seus membros.

Campus Prof. Soane Nazaré de Andrade, Ilhéus, Bahia, vinte e dois de agosto de 2006.

Dr.^a Rachel Passos Rezende
Orientadora

Dr. Alexandre Soares Rosado
Examinador

Dr. Eduardo Gross
Examinador

Universidade Estadual de Santa Cruz
Programa de Pós-Graduação em Sistemas Aquáticos e Tropicais
Mestrado Acadêmico em Ecologia
Campus Prof. Soane Nazaré de Andrade, Km 16 – Rodovia Ilhéus Itabuna
Fone: (73) 3680-5381 - Fax: (73) 3680-5381
Cep: 45650-000 – Ilhéus-Bahia-Brasil
e-mail: ppgsat20042@yahoo.com.br

DEDICATÓRIA

Às pessoas que não mediram esforços para que eu alcançasse esta vitória: meus pais Admir e Selda Wetler, meus grandes amores.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que me capacitou e me deu forças para vencer todos os obstáculos.

À minha orientadora **Rachel Passos Rezende**, minha “mãe acadêmica”, por acreditar no meu trabalho e investir em mim, pela amizade e compreensão durante estes dois anos.

À **CAPES**, pela concessão da bolsa.

Aos meus pais, **Admir e Selda**, pelas orações e noites perdidas, pelo amor incondicional, pelo apoio financeiro, emocional e espiritual em todas as situações e pelo incentivo para que eu conseguisse alcançar este objetivo.

Aos meus irmãos **Júnior, Henrique e Bruno** pela cumplicidade em todos os momentos.

Ao meu noivo **William Tonini**, meu grande amor, amigo e companheiro, por ser o maior incentivador na minha vida profissional e pessoal, por me oferecer carinho, segurança e por me fazer acreditar na minha capacidade.

Aos estagiários do Laboratório de Monitoramento Ambiental, meus “filhos do coração” **Cleidianne Rodrigues, Lidiane Barreto e Miguel Santos**, pela amizade e ajuda prestada durante o trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Monitoramento Ambiental, **Gislaine Silva, Ronaldo Argôlo e Ana Cácia Freire**, pela imensa contribuição na execução dos experimentos.

À minha segunda família, grandes amigos da república e “agregados” **Alessandra (Lelê), Eduardo (Du), Raquel (Quel) e Rodrigo (Bebê)**, por estarem sempre ao meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis, me dando apoio emocional.

Às professoras **Erminda Guerreiro Couto e Bianca Mendes Maciel**, que são para mim grandes exemplos na vida pessoal e profissional.

Ao **Nadson**, colega de mestrado e grande amigo, pela ajuda na análise estatística e pelas orações.

Aos amigos que encontrei durante o mestrado, **Ana Tereza, Daniela, Leonardo e Thaís** por estarem sempre presentes e por tudo o que aprendi com eles.

Aos **professores do programa de pós-graduação em Sistemas Aquáticos Tropicais**, por tudo o que me foi ensinado durante estes dois anos de curso.

Sou muito grata a todos os que contribuíram direta e indiretamente para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xiv
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1 Manguezal.....	1
1.1.1 Poluição por petróleo e derivados em manguezais.....	6
1.2 Petróleo e derivados.....	7
1.3 Biodegradação e biorremediação microbiana.....	15
1.4 Vias metabólicas para a degradação aeróbia de compostos aromáticos.....	21
1.5 Estudo da diversidade microbiana.....	27
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 Geral.....	32
2.2 Específicos.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Área de estudo.....	33
3.2 Coleta da amostra.....	35
3.3 Experimento de contagem microbiana e seleção de microrganismos degradadores de petróleo.....	35

3.3.1	Tratamento 1.....	35
3.3.2	Tratamento 2.....	36
3.3.3	Análise estatística.....	36
3.4	Manutenção dos microrganismos.....	39
3.5	Análise da produção de CO ₂ no sedimento.....	40
3.6	Padronização dos Inóculos.....	42
3.7	Análise qualitativa para produção de biossurfactantes.....	43
3.7.1	BTX (benzeno, tolueno e xileno) como fonte de carbono.....	43
3.7.2	Glicose como fonte de carbono.....	44
3.7.3	Produção de biossurfactantes.....	44
3.8	Screening em BTX (Benzeno, tolueno e xileno).....	45
3.8.1	Determinação da via de clivagem do catecol.....	45
3.8.2	Padronização dos protocolos de extração de DNA e PCR para os microrganismos utilizadores de BTX.....	46
3.8.2.1	Extração de DNA.....	46
3.8.2.2	Amplificação por PCR.....	47
3.8.2.3	Purificação dos fragmentos amplificados.....	48
3.8.2.4	PCR em placa pré-sequenciamento.....	48
3.8.2.5	Precipitação do DNA.....	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1	Contagem de microrganismos em placas com meio para heterotróficos totais (HT).....	50
4.2	Contagem de microrganismos em placas com meio para degradadores de petróleo.....	52
4.3	Análise da evolução de CO ₂ no sedimento.....	55

4.4	Teste de colapso da gota para detecção da produção de biossurfactantes.....	57
4.5	Screening em BTX (Benzeno, tolueno e xileno).....	58
4.6	Determinação da via de clivagem do catecol.....	61
4.7	Extração de DNA, PCR e purificação.....	68
5	CONCLUSÕES.....	71
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1	Representações da fórmula molecular do benzeno..... 11
Fig. 2	Representações da fórmula molecular do tolueno..... 12
Fig. 3	Representação da fórmula molecular dos três isômeros do xileno..... 14
Fig. 4	Estrutura química da lignina..... 22
Fig. 5	Transformação de compostos aromáticos em catecol..... 23
Fig. 6	Clivagem extradiol proximal e distal, e intradiol do anel do catecol por dioxigenases..... 24
Fig. 7	Representação da degradação do catecol pelas vias meta e orto..... 26
Fig. 8	Manguezal do Acuípe e município de Una..... 33
Fig. 9	Localização do município de Una..... 34
Fig. 10	Esquema do experimento de contagem microbiana..... 38
Fig. 11	Esquema do procedimento de manutenção dos microrganismos..... 39
Fig. 12	Frasco biométrico para análise da produção de CO ₂ 40
Fig. 13	Esquema do experimento de produção de CO ₂ 41
Fig. 14	Esquema ilustrativo da padronização de inóculos com o cartão de Wickerham..... 43
Fig. 15	Esquema do experimento de colapso da gota..... 44
Fig. 16	Esquema do screening em BTX..... 45
Fig. 17	Médias das 8 diluições efetuadas em duplicata para contagem de microrganismos de sedimento não contaminado (Trat 1) e contaminado (Trat 2) com petróleo em placas com meio de heterotróficos totais (HT)..... 50

Fig. 18	Médias das 8 diluições efetuadas em duplicata para contagem de microrganismos de sedimento não contaminado (Trat 1) e contaminado (Trat 2) com petróleo em placas com meio mineral com petróleo (PET).....	53
Fig. 19	ANOVA “two way” e teste de Tukey da contagem de microrganismos de sedimento de manguezal sem adição de petróleo (normal) e com adição de petróleo em placas com meio para heterotróficos totais e com meio para degradadores de petróleo.....	55
Fig. 20	Média de duas repetições da evolução da produção de CO ₂ em sedimento de manguezal impactado e não impactado com petróleo..	56
Fig. 21	Transformação do benzeno em catecol.....	62
Fig. 22	Orto clivagem do catecol.....	63
Fig. 23	Via orto de degradação do catecol a succinato + acetil-Co-A.....	64
Fig. 24	Meta clivagem do catecol.....	65
Fig. 25	Via meta de degradação do catecol a piruvato + acetaldeído.....	66
Fig. 26	Gel de agarose mostrando as bandas do DNA extraído das bactérias isoladas. Na primeira canaleta foi aplicado o marcador, na segunda o isolado 2, na terceira o 3A, na quarta o 3B, na quinta o 128A, na sexta o 128B, na sétima o 154A, na oitava o 154B, na nona o 80, na décima o 85 e na décima primeira o 93.....	68
Fig. 27	Gel de agarose mostrando as bandas do DNA amplificado e purificado das bactérias isoladas. Na primeira canaleta foi aplicado o marcador, na segunda o isolado 2, na terceira o 3A, na quarta o 3B, na quinta o 80, na sexta o 85, na sétima o 93, na oitava o 128A, na nona o 128B, na décima o 154A e na décima primeira o 154B.....	69

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tab. 1	Principais tratamentos e suas funções na extração do DNA microbiano total de solo para o estudo da diversidade microbiana.....	30
Tab. 2	Screening em BTX das bactérias isoladas a partir do sedimento de manguezal sem adição de petróleo.....	58
Tab. 3	Screening em BTX das bactérias isoladas a partir do sedimento de manguezal com adição de petróleo.....	60
Tab. 4	Via de degradação do catecol por bactérias isoladas a partir do sedimento de manguezal não contaminado com petróleo.....	61
Tab. 5	Via de degradação do catecol por bactérias isoladas a partir do sedimento de manguezal contaminado com petróleo.....	62

**PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS RESPONSÁVEIS PELA DEGRADAÇÃO
DE COMPOSTOS DE PETRÓLEO NO SEDIMENTO DE UM MANGUEZAL
LOCALIZADO NO SUL DA BAHIA (BRASIL)**

RESUMO

Os objetivos deste trabalho concentraram-se no isolamento de microrganismos presentes no sedimento de um manguezal que não tem histórico de contaminação com o petróleo, testando *in vitro* a sua capacidade de utilizar o petróleo como única fonte de carbono, verificar a produção de biossurfactantes durante a biodegradação e a produção de CO₂ no sedimento com e sem adição de petróleo. Além disso, foram selecionados 10 isolados bacterianos de interesse biotecnológico, através de screening com compostos aromáticos e determinada a via de degradação dos mesmos. As bactérias foram submetidas à extração de DNA e PCR para posterior identificação por sequenciamento. A partir dos experimentos realizados, observou-se a contagem em placas de heterotróficos totais atingindo 10⁸ UFC.mL⁻¹, e em placas com petróleo 10⁷ UFC.mL⁻¹ no sedimento sem adição de petróleo; e iguais valores para o sedimento com adição de petróleo, sugerindo o efeito seletivo do petróleo sobre a comunidade microbiana, modificando a riqueza das espécies sem alterar o número de microrganismos. Foi observada a diferença na mineralização de matéria orgânica no sedimento com e sem a adição de petróleo, com uma fase de adaptação dos microrganismos ao poluente e a influência do petróleo como fonte extra de carbono, aumentando a produção de CO₂ no sedimento. Constatou-se também a grande capacidade de seleção do BTX sobre os microrganismos, observando-se três capazes de utilizar BTX entre os 234 isolados em placas de petróleo a partir do sedimento normal; e sete que cresceram em BTX entre os 156 isolados em placas de petróleo a partir do sedimento incubado com petróleo. Pôde-se observar que nove das bactérias selecionadas utiliza a via orto de degradação do catecol e uma utiliza a via meta, a seguir, foram padronizados os protocolos de extração de DNA e PCR para estas bactérias. Concluiu-se que o sedimento do manguezal estudado possui microrganismos com potencial degradativo, assim, o estudo destes constitui uma importante ferramenta para buscar soluções que minimizem o impacto causado por derramamentos acidentais de petróleo no ambiente.

Palavras-chave: BTX, catecol, manguezal, biodegradação, petróleo.

ABSTRACT

The aims of this work were: the isolation of microorganisms from a mangrove sediment that have no history of oil contamination; testing the capability of microorganisms to use oil as the sole carbon source; verify the biosurfactant production during the biodegradation; and CO₂ production in the sediment with and without oil addition. Ten bacterial strains of biotechnological interest had been selected through screening with aromatic compounds and the degradation pathway of catechol was determined. The strains were submitted to DNA extraction and PCR for molecular identification. It was observed 10⁸ CFU.mL⁻¹ of microorganisms in counting plates of total heterotrophic and 10⁷ CFU.mL⁻¹ in plates with petroleum for the sediment without oil, and equal values for sediment with oil addition, the results suggests the selective effect of the oil on the microbial diversity. It was verified a difference in mineralization of organic material between the sediment with and without oil, showing a adaptation phase to the pollutant and was observed the influence of the oil as extra carbon source, increasing the CO₂ production in the sediment. The selection of microorganisms by BTX was also evidenced, observing three isolates capable to use BTX between the isolates in plates with petroleum from the normal sediment; and seven that grown in BTX between the isolates in plates with petroleum from the sediment incubated with oil. It was observed that nine of the selected bacteria use the orto pathway for catechol degradation and one use the meta pathway. It was concluded that the sediment of the studied mangrove possess microorganisms with degradative potential, thus, these study was important to search solutions that minimize the impact caused by accidental oil spills in the environment.

Key words: BTX, catechol, mangrove, biodegradation, petroleum.

1- INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1- Manguezal

Os manguezais encontram-se entre os ecossistemas mais produtivos do mundo (KATHIRESAN & BINGHAM, 2001; OLIVEIRA, 2000), produzindo carbono orgânico acima do requerimento do sistema e contribuindo significativamente para o ciclo do carbono. Além disso, são responsáveis pela proteção e estabilidade da costa, enriquecem as águas costeiras, fornecem vários produtos com valor comercial e sustentam pescarias costeiras. Suas características únicas fazem destes ambientes lugares ideais para estudos experimentais de função do ecossistema e da biodiversidade (KATHIRESAN & BINGHAM, 2001).

Os manguezais chegaram a cobrir 3/4 das linhas costeiras dos países tropicais e sub-tropicais. Atualmente, resta menos de 50% da cobertura original, e destes, mais da metade encontra-se degradada, principalmente devido a atividades antropogênicas (DINESH et al., 2004). A costa brasileira apresenta uma das maiores extensões de manguezais do mundo, que se caracteriza por uma estreita faixa de florestas de mangue, com cerca de 20 mil Km², abrangendo desde o extremo norte do país, no Amapá, até o sul, no estado de Santa Catarina (GUIMARÃES & SILVA, 1997; CURY, 2002). As árvores de mangue consistem na principal vegetação ocorrente ao longo das margens dos estuários brasileiros, atuando nestas regiões

como barreiras naturais, onde as raízes, ou mesmo os troncos, agem contra a força erosiva dos ventos e das ondas (GUIMARÃES & SILVA, 1997).

As florestas de mangue são ecossistemas costeiros estuarinos que possuem águas ricas em material em suspensão e que não são perturbadas, constituindo ecossistemas de baixa energia, sendo delimitados, normalmente pela linha da maré alta (CURY, 2002, GUIMARÃES & SILVA, 1997). A salinidade das águas dos manguezais pode variar de 0,5‰ a 30‰. Na superfície do solo, a salinidade geralmente diminui com a distância dos rios e canais, exceto em áreas desprovidas de vegetação, onde há evaporação da água pela insolação e circulação do ar. Os teores de oxigênio nas águas dos canais responsáveis pela inundação em geral obedecem um padrão decrescente desde a área próxima à baía até a parte superior do manguezal (CURY, 2002).

Os solos de mangue são formados pela deposição de partículas de origem terrígena e marinha, orgânicas e inorgânicas, que se encontram em suspensão na água, e que se movimentam em função das correntes de fluxo e refluxo das marés. Através desta ação mecânica, as partículas maiores se depositam primeiro, e em seguida as de argila e silte, as quais se agregam e decantam por floculação (CURY, 2002). Estes solos são pouco consolidados e apresentam uma coloração que varia de marrom escura a negra devido à grande produtividade de algumas algas, principalmente as diatomáceas. Com a inundação constante pelas águas do mar, a pobreza de oxigênio e a presença de bactérias que liberam gás sulfídrico, os sedimentos apresentam um forte odor característico (GUIMARÃES & SILVA, 1997).

Com um pequeno número de espécies altamente especializadas, as árvores de mangue crescem na interface entre a terra e o mar, em condições de grande variação de salinidade, variações de marés e solos lodosos e anóxicos. Estas espécies de árvores apresentam adaptações a estas condições, como modificações no sistema de raízes, com raízes escora ou aéreas, que auxiliam na oxigenação e fixação aos solos inundados e muito móveis (*Rhizophora mangle*) ou pneumatóforos (*Laguncularia* sp., *Avicennia* sp.), que auxiliam na captação de oxigênio além de glândulas foliares capazes de excretar o excesso de sal (*Avicennia* sp.). Os manguezais restringem-se a regiões tropicais e subtropicais devido à baixa resistência de sua vegetação ao frio, sendo a temperatura mínima 16° C da isoterma da água (CURY, 2002; KATHIRESAN & BINGHAM, 2001; GUIMARÃES & SILVA, 1997).

Manguezais são ambientes ricos em nutrientes, onde, sob os solos lodosos, há uma textura de raízes e material vegetal parcialmente decomposto. Bactérias e fungos decompõem as folhas e a lignina dos troncos das árvores de mangue e a cadeia alimentar é baseada no uso dos detritos resultantes desta decomposição (GUIMARÃES & SILVA, 1997). A matéria orgânica produzida pelos manguezais forma a base de uma intrincada rede alimentar detritívora, assim, as plantas decompostas, junto com os microrganismos associados são ingeridos pela fauna bêntica detritívora, a qual serve de alimento para organismos maiores, estabelecendo-se assim a rede trófica destes ecossistemas (HERNANDEZ-ANTARA & SOLIS-WEISS, 1987). Portanto, a grande riqueza de nutrientes encontrada nos manguezais resulta da decomposição microbiana da matéria orgânica e inorgânica

ali produzida e também trazida dos ecossistemas vizinhos. A produção desta matéria orgânica excede o consumo dos manguezais, e este excedente se acumula no sistema, ou é exportado para outros ecossistemas. Esta matéria orgânica é levada como material particulado, ou sob a forma de organismos vivos, que após consumir os nutrientes do manguezal e aumentar a sua biomassa, migram para outro ambiente (GUIMARÃES & SILVA, 1997).

Muitas pesquisas têm sido realizadas em manguezais, demonstrando a importância dos microrganismos para a manutenção do ecossistema. SILVA et al., (2005) avaliaram a qualidade ambiental do sedimento de um manguezal através da relação da atividade respiratória bacteriana com os parâmetros abióticos, granulometria e nutrientes. Para estimar a quantidade de bactérias em sedimento de manguezal, DYE sugeriu em 1983, um método baseado na coloração com laranja de acridina e contagem em microscópio de epifluorescência. Em 1989, BOTO e colaboradores estudaram a interação entre as bactérias e o carbono orgânico dissolvido (COD) na interface sedimento-água de manguezal. BANO et al., (1997) avaliaram a significância das bactérias no fluxo de matéria orgânica em ecossistemas de manguezal, avaliando parâmetros como a abundância bacteriana, biomassa, produção bacteriana de carbono e produção primária; demonstrando uma forte ligação entre a produção e a remoção bacteriana de matéria orgânica. ALONGI (1988) estudou a produtividade bacteriana e biomassa microbiana no sedimento de cinco manguezais de Austrália. Em 1993, junto com outros pesquisadores, verificou a influência do tipo de floresta de mangue sobre a relação nutrientes-microrganismos, demonstrando uma íntima conexão entre microrganismos, nutrientes e plantas agindo

como um mecanismo para conservar os escassos nutrientes necessários para a existência dos manguezais. Em 1994, estudou o papel das bactérias na reciclagem de nutrientes, demonstrando sua importância na rede trófica destes ecossistemas. KATHIRESAN & BINGHAM também demonstraram em 2001 a importância ecológica dos microrganismos decompositores, como as bactérias sulfato-redutoras, que sustentam a cadeia alimentar detritívora no sedimento do manguezal através da decomposição. Além disso, é evidenciada a participação de alguns fungos, bem como de bactérias na ciclagem de nutrientes, como o ciclo do nitrogênio e do carbono.

A destruição de habitats constitui uma das causas primárias de perdas de manguezais. Diversão e uso de água doce para irrigação têm destruído extensas áreas de florestas de mangue. Nas últimas décadas, muitos quilômetros de áreas de manguezal foram transformados em fazendas de aquicultura, alterando o habitat natural. Alguns estudos indicam níveis alarmantes de destruição dos manguezais, estimando-se uma perda global de cerca de um milhão de hectares por ano, e manguezais de algumas regiões em risco de completa degradação. Devido à localização das florestas de mangue em regiões estuarinas, estes ecossistemas encontram-se intimamente ligados a atividades humanas e, conseqüentemente, sujeitos à contaminação por resíduos provenientes destas (YU et al., 2005; KATHIRESAN & BINGHAM, 2001)

1.1.1- Poluição por petróleo e derivados em manguezais

Entre as agressões sofridas pelas áreas de manguezal, podem-se destacar os derramamentos de petróleo, que ocorrem normalmente, devido a atividades portuárias e industriais, por exemplo, o transporte de petróleo e seus derivados e a indústria petroquímica. Visto que os portos, indústrias e municípios estão concentrados em estuários, os habitats de manguezal, que constituem berçários para várias espécies de peixes e outros animais comercialmente importantes, são particularmente vulneráveis a derramamentos de óleo (BURNS et al., 2000).

Devido a algumas características, como a alta concentração de matéria orgânica e condições anóxicas, geralmente, menos de 1 cm da superfície é aeróbia e os sedimentos de manguezal acumulam com facilidade poluentes como os hidrocarbonetos de petróleo (CURY, 2002; RAMSAY et al., 2000). Alguns estudos sugerem que a taxa de biodegradação de hidrocarbonetos em sedimentos de manguezais é principalmente limitada pela baixa concentração de oxigênio, uma vez que os principais degradadores de petróleo são aeróbios, outro fator limitante são os níveis de nutrientes do sistema, principalmente nitrogênio e fósforo (RAMSAY et al., 2000).

As marés negras apresentam efeitos tóxicos sobre a fauna marinha. Compostos como benzeno, tolueno e xilenos causam danos ao organismo humano e de outros seres vivos (LEE & LIN, 2006; TIBURTIUS et al., 2004; CORSEUIL et al., 1996). Estes poluentes influenciam sistemas endócrinos e enzimáticos, além disso, hidrocarbonetos ingeridos por organismos marinhos passam através da parede

intestinal e se tornam parte da reserva lipídica. Quando dissolvidos no tecido adiposo, os hidrocarbonetos são preservados, porque estão protegidos da degradação microbiana, podendo ser transferidos através da cadeia alimentar e, eventualmente, ao homem sem alterações da estrutura. Muitos seres expõem-se à contaminação por hidrocarbonetos derivados do petróleo por ingestão de cadáveres, ou de outros animais ou plantas que tenham acumulado hidrocarbonetos. Isto traz sérias implicações para a pesca e a saúde. A exposição prolongada a concentrações sub-letais de poluentes pode tornar o organismo mais susceptível a patologias (LEE & LIN, 2006). O aparecimento de tumores, alterações genéticas e leucemias são algumas conseqüências clínicas da intoxicação por hidrocarbonetos (LEE & LIN, 2006; TIBURTIUS et al., 2004; CORSEUIL et al., 1996). Anualmente, milhões de toneladas de resíduos de diversas naturezas são produzidos pelas indústrias e acumulados no meio ambiente, representando uma grande ameaça à qualidade de vida da população mundial (MACIEL, 2004).

1.2- Petróleo e derivados

O petróleo, formado por processos biogeoquímicos, é uma substância oleosa, inflamável, menos densa que a água, com cheiro característico e de cor variando entre o negro e o castanho escuro, constituído por uma mistura bastante complexa de hidrocarbonetos, e em menores quantidades, de compostos não hidrocarbônicos. Sua composição varia em função de sua localização geográfica e das condições físicas, químicas e biológicas que o originaram. Na composição do petróleo, as

moléculas menores, com um a quatro átomos de carbono, formam os gases; moléculas maiores (de quatro a cerca de dez átomos de carbono) constituem a gasolina; moléculas de até cinqüenta átomos de carbono são as dos combustíveis leves e óleos lubrificantes; e moléculas de várias centenas de átomos de carbono, compõem combustíveis pesados, ceras e asfaltos. Junto aos hidrocarbonetos gasosos há até 15% de nitrogênio, dióxido de carbono e ácido sulfídrico, além de pequena porção de hélio e outros gases. Nos hidrocarbonetos líquidos em geral se encontram traços de oxigênio, enxofre e nitrogênio, combinados com as moléculas de hidrocarbonetos ou na forma elementar (CRAPEZ et al., 2002; <http://www.cepa.if.usp.br/energia/energia1999/Grupo1A/composicao.html>).

Admite-se que sua origem esteja ligada à decomposição bacteriana dos seres que constituem o plâncton sob situações de hipóxia. Estes seres decompostos foram, ao longo de milhões de anos, se acumulando no fundo dos mares e dos lagos, sendo pressionados pelos movimentos da crosta terrestre, transformando-se no petróleo. Este se desloca, saindo da rocha matriz, chegando a terrenos denominados bacias sedimentares, onde se concentra. Estas bacias são formadas por camadas ou lençóis porosos de areia, arenitos ou calcários. O petróleo aloja-se ali, ocupando os poros rochosos formando "lagos", onde se acumula, formando jazidas, nas quais são encontrados o gás natural, na parte mais alta, e petróleo e água nas mais baixas (http://www.cepetro.unicamp.br/petroleo/index_petroleo.html).

A susceptibilidade dos componentes do petróleo à biodegradação varia com a concentração e o tamanho da molécula do hidrocarboneto. Por exemplo, os alcanos de cadeia hidrocarbônicas na faixa C_{10} a C_{26} são degradados rapidamente, ao passo

que os alcanos de cadeia curta são tóxicos a muitos microrganismos, mas geralmente, sofrem processo de volatilização rápida. Os cicloalcanos são particularmente resistentes à biodegradação, enquanto compostos tripentacíclicos estão entre os mais persistentes (CHOSSON et al., 1991). Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) com mais de quatro anéis de benzeno fusionados são mais resistentes à biodegradação do que aqueles com três ou quatro anéis. Geralmente, um aumento no número de anéis fusionados aumenta a estabilidade química e hidrofobicidade da molécula de HPA, tornando-o menos susceptível à biodegradação (YU et al., 2005; KANALY et al., 2000).

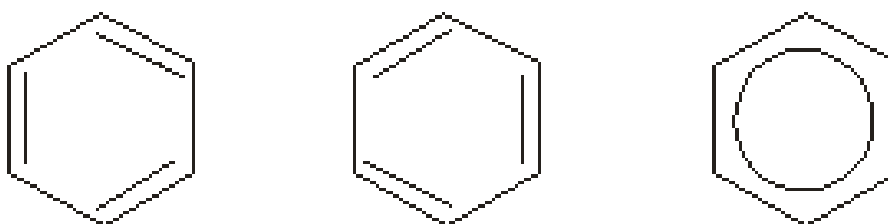
Os hidrocarbonetos monoaromáticos, benzeno, tolueno e os três xilenos orto, meta e para, chamados compostos BTX, são os constituintes da gasolina que têm maior solubilidade em água e, portanto, são os contaminantes que primeiro irão atingir o lençol freático (OTENIO et al., 2005; TIBURTIUS et al., 2004; CORSEUIL & MARINS, 1997). Os hidrocarbonetos aromáticos (BTX e outros alquilbenzenos) são encontrados em uma considerável proporção na gasolina, perfazendo cerca de 10 a 59% desta, enquanto que os hidrocarbonetos alifáticos compreendem 41 a 62%. Os hidrocarbonetos aromáticos são geralmente mais tóxicos que os compostos alifáticos com o mesmo número de carbonos e possuem maior mobilidade em água, em função da sua solubilidade em água ser da ordem de 3 a 5 vezes maior. Esta solubilidade aumenta ainda mais com a adição de etanol à gasolina, uma vez que o etanol é completamente miscível à água, a presença deste aumenta a solubilidade do BTX por co-solvência (TIBURTIUS et al., 2004; CORSEUIL et al., 1998; CORSEUIL & ALVAREZ, 1996). Hidrocarbonetos aromáticos têm também maior

mobilidade em sistemas solo-água, além de migrarem mais rapidamente através das águas atingindo mananciais de abastecimento, os compostos aromáticos apresentam uma toxicidade crônica mais significativa do que os hidrocarbonetos alifáticos (TIBURTIUS et al., 2004; CORSEUIL et al., 1998; CORSEUIL & ALVAREZ, 1996).

Estudos sobre a poluição de aromáticos no ar, destacam que os hidrocarbonetos aromáticos provocam danos à saúde, principalmente devido à toxicidade e/ou mutagenicidade ou carcinogenicidade do BTX. Também advertem que a inalação de tolueno ou xilenos pode induzir distúrbios no modo de falar, na visão, audição, no controle dos músculos e outros, além de sugerirem a associação entre benzeno e xilenos e o surgimento de tumores cerebrais (TIBURTIUS et al., 2004; CORSEUIL & ALVAREZ, 1996).

O benzeno (Figura 1) é um hidrocarboneto aromático que se apresenta como um líquido incolor, lipossolúvel, volátil, inflamável, de odor característico. É um irritante das mucosas e sua aspiração em altas concentrações pode provocar edema pulmonar. Os vapores são, também, irritantes para as mucosas oculares e respiratórias. A absorção do benzeno provoca efeitos tóxicos para o sistema nervoso central causando de acordo com a quantidade absorvida, narcose e excitação seguida de sonolência, tonturas, cefaléia, náuseas, taquicardia, dificuldade respiratória, tremores, convulsões, perda da consciência e morte (http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/benzeno_01.htm). A exposição a esta substância a longo prazo pode causar alterações hematológicas, neurológicas e neuropsicológicas em seres humanos, como distúrbios na atenção, percepção,

memória, habilidade motora, raciocínio lógico, linguagem, aprendizagem e humor, além de outras anormalidades, como alterações cromossômicas numéricas e estruturais em linfócitos e em células da medula óssea (http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/benzeno_01.htm). Investigações ocupacionais em diferentes indústrias mostram que o benzeno desempenha um indubitável papel de risco aos humanos (TIBURTIUS et al., 2004; CORSEUIL & ALVAREZ, 1996).



Fonte: www.wikipedia.org

Figura 1: Representações da fórmula molecular do benzeno.

O tolueno, também conhecido como toluol, metilbenzeno, metilbenzol e fenilmetano (Figura 2), é um líquido incolor, não corrosivo, altamente volátil e com um odor aromático muito forte. Os seus vapores são mais pesados que o ar e muito inflamáveis, pelo que constituem um útil aditivo da gasolina. Este hidrocarboneto é pouco solúvel em água, mantendo-se apenas à superfície. Porém é uma substância miscível em compostos orgânicos, como álcool, clorofórmio, éter, acetona, e ácido acético glacial (IRWIN, 1997). O tolueno é produzido, na sua maior parte, a partir do petróleo ou de processos petroquímicos e, em escala menor, pode derivar da manufatura metalúrgica do carvão de coque. A combustão, presente nos processos

de queima de madeiras e de lixo é também responsável pela liberação de alguma quantidade deste tóxico (IRWIN, 1997). O tolueno é amplamente utilizado na indústria como solvente, e vem sendo categorizado como um dos poluentes prioritários para algumas agências de proteção ambiental, ministérios do meio ambiente e organizações de saúde (HALLIER-SOULIER et al., 1996). Segundo SMITH (1990) e SANTOS (2004), esta substância pertence a uma família de organopoluentes carcinogênicos e neurotóxicos que freqüentemente contaminam o solo e ambientes aquáticos como consequência de vazamentos, e é conhecido por ser extremamente tóxico às células, mesmo em baixas concentrações. Ao se acumular, ele rompe a membrana celular, assim afetando a estrutura e função da célula.

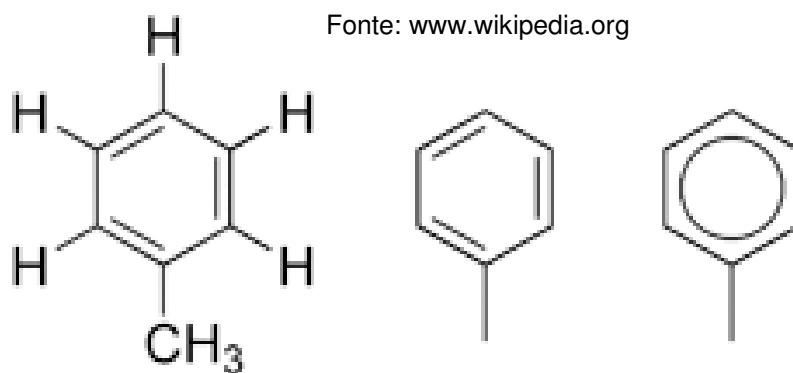


Figura 2: Representações da fórmula molecular do tolueno.

Na sua maior porcentagem, o tolueno produzido é convertido em benzeno, fenol e cresol. Em menor proporção, é utilizado como aditivo da gasolina e óleos lubrificantes, como constituinte de aerossóis e como solvente para colas, tintas,

resinas termostáveis e adesivos. Participa ainda na fabricação de detergentes e produtos de limpeza, herbicidas e fungicidas fumigantes, vernizes, perfumes, produtos farmacêuticos e sacarina (IRWIN, 1997).

A degradação do tolueno nos solos está sujeita a um período de prévia adaptação, durante o qual se verifica o crescimento dos microrganismos intervenientes. De acordo com RICHARDSON (1988) e ATLAS & BARTHA (1992), este processo é condicionado pela presença de nutrientes, como o nitrogênio, a amônia, os nitratos e o oxigênio, sendo ainda inversamente influenciado pela compactação dos solos e pelo seu teor em umidade.

Segundo o manual de produtos químicos perigosos da CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) o xileno, também é conhecido como dimetilbenzeno ou xilol; e possui três isômeros: orto, meta e para (Figura 3). Caracteriza-se por ser um líquido sem coloração, com um odor doce. Esta substância flutua na água e produz vapor irritante e inflamável (<http://www.cetesb.sp.gov.br>). Este produto é largamente utilizado pelas indústrias de tintas e vernizes; possui grande utilização como solvente para resinas acrílicas; dissolve a dibenzil celulose, o óleo de mamona, óleo de linhaça e borracha. É também bastante empregado pelos fabricantes de Thinner e redutores como diluente. É utilizado ainda nas formulações de tintas de impressão e tintas têxteis. Pela grande capacidade de dissolver altas concentrações de princípios ativos e sua alta volatilidade, o xileno é, ainda, muito utilizado nas formulações de pesticidas (TRINDADE et al., 2003).

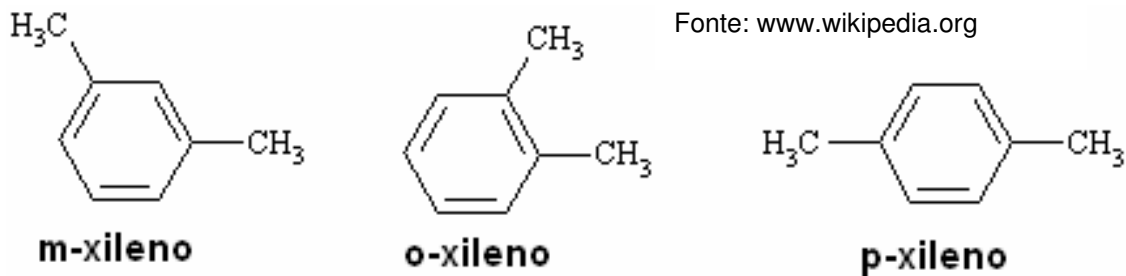


Figura 3: Representação da fórmula molecular dos três isômeros do xileno.

Os isômeros do xileno afetam o cérebro, podendo causar dores de cabeça, falta de coordenação muscular, desmaio e confusão mental. O xileno é um hidrocarboneto aromático que tem características semelhantes ao benzeno, porém menos mielotóxico, menos volátil e sem ototoxicidade. Pode ser hepatotóxico, neurotóxico e causar irritação de olhos, pele e mucosas, além de náuseas, cefaléia, tonturas, sonolência e coma, dependendo da concentração a que o indivíduo tenha sido exposto (TRINDADE et al., 2003).

Grande parte dos componentes do petróleo (de 60% a 90%) é passível de biodegradação. Entretanto, o restante bruto ou refinado é recalcitrante. Mesmo tratando-se de uma fração menor (de 10% a 40%), deve-se ressaltar que isso significa toneladas de material poluente impactando o ambiente e podendo ser bioacumuladas nos seres vivos. Assim, o destino dessa substância no ambiente, após um derrame, dependerá da interação de vários fatores, entre estes, pode-se destacar a biodegradação (CRAPEZ et al., 2002).

1.3- Biodegradação e biorremediação microbiana

O potencial dos microrganismos como agentes degradadores de alguns componentes indicam que os tratamentos biológicos sejam a mais promissora alternativa para reduzir o impacto ambiental causado por derramamentos de óleo e contaminação por compostos com BTX (benzeno, tolueno e xileno). A degradação microbiana é considerada o melhor processo para “limpar” sedimentos contaminados por HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos). Estudos sugerem que as comunidades microbianas indígenas apresentam um potencial considerável para remediar os sedimentos contaminados por óleo (YU et al., 2005).

Bactérias degradadoras de petróleo ocorrem extensivamente em uma grande quantidade de ambientes aquáticos e marinhos, incluindo o sedimento e a coluna d'água (RAMSAY et al., 2000; FLOODGATE, 1995). Segundo BRADDOCK et al. (1996), as populações de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos em sedimentos marinhos contaminados com petróleo são maiores do que nos não contaminados. As populações destes microrganismos constituem, normalmente, menos de 1% do total das comunidades microbianas. Mas, quando poluentes derivados do petróleo estão presentes, estas populações degradadoras de hidrocarbonetos aumentam para 10% da comunidade (ATLAS, 1995).

Muitos microrganismos são capazes de degradar hidrocarbonetos do petróleo. Alguns são degradadores de alcanos, outros de aromáticos, e alguns conseguem metabolizar ambos (CURY, 2002). Alcanos C_{10} a C_{26} são mais facilmente degradados. Entre os aromáticos, os de baixa massa molecular, como o benzeno,

tolueno e xileno, que estão entre os componentes tóxicos do petróleo, são facilmente degradados pelos microrganismos marinhos. Moléculas com estruturas mais complexas, contendo ramificações e anéis aromáticos, são degradadas por um número menor de microrganismos e com uma taxa de degradação menor, quando comparadas com moléculas de estruturas mais simples (CURY, 2002).

Nenhuma espécie microbiana, no entanto, é capaz de degradar sozinha todos os componentes do petróleo, a complexidade dos processos metabólicos necessários a essa degradação leva à formação de consórcios, com bactérias de diferentes gêneros e espécies, cada uma especializada em degradar uma ou várias frações do óleo derramado (MACIEL, 2004; CRAPEZ et al., 2002). Os principais gêneros são Acidovorans, Acinetobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Aeromonas, Arthrobacter, Beijemickia, Burkholderia, Bacillus, Comomonas, Cycloclasticus, Flavobacterium, Goordona, Moraxella, Mycobacterium, Micrococcus, Neptunomonas, Nocardia, Pasteurella, Pseudomonas, Rhodococcus, Streptomyces, Sphingomonas, Stenotrophomonas e Vibrio (CRAPEZ et al., 2002). Derrames sucessivos no mesmo ambiente aceleram o aumento da biomassa bacteriana degradadora de hidrocarbonetos. A maior concentração dessas bactérias, portanto, serve como um indicador de ambiente impactado cronicamente por petróleo (CRAPEZ et al., 2002). Assim, o estudo da diversidade microbiana autóctone torna-se fundamental para a compreensão das funções exercidas pelos microrganismos diante da contaminação dos habitats por petróleo e derivados (MACIEL, 2004).

A biodegradação de compostos orgânicos por populações naturais de microrganismos representa um dos mecanismos primários pela qual, compostos poluentes são eliminados do meio ambiente, pois os microrganismos autóctones são capazes de sobreviver, crescer e metabolizar em seu habitat e competir com outros membros da comunidade (ALEXANDER, 1977). O benefício máximo desse processo é a transformação do poluente em compostos simples como CO_2 e H_2O (ATLAS, 1981). Este processo ocorre ao nosso redor todo o tempo, sendo parte de um ciclo natural que forma as bases da vida no nosso planeta (WYATT & PALMER, 1991).

A capacidade para metabolizar compostos aromáticos e usá-los como fonte de carbono e energia para o crescimento é demonstrada por muitas espécies de bactérias e fungos com algumas versatilidades a mais que outras espécies na abrangência das enzimas e vias metabólicas disponíveis. Para crescer em tais compostos o organismo deve ser capaz de quebrar ao menos parte da molécula, em um composto mais simples, intermediário na via metabólica. Nos ambientes naturais, a maior parte da matéria orgânica é mineralizada aerobicamente, porém este processo pode ocorrer também na ausência de oxigênio (HOPPER, 1991; SMITH, 1990).

A biorremediação é o processo mais utilizado na degradação de BTX. Este processo fundamenta-se na oxidação biológica por microrganismos, decompondo a matéria orgânica em substâncias mais simples como CO_2 e H_2O ou CH_4 e CO_2 , com custos relativamente baixos. Diversas pesquisas mostraram que vários grupos de bactérias e fungos têm habilidade para degradar componentes do petróleo. A complexidade dos processos metabólicos necessários a essa degradação leva à

formação de consórcios, com bactérias de diferentes gêneros e espécies, cada uma especializada em degradar uma ou várias frações do óleo derramado. A grande motivação de todos os pesquisadores envolvidos em estudos de biodegradação é, sem dúvida, a busca de microrganismos versáteis capazes de degradarem, de maneira eficiente, uma grande variedade de poluentes a baixo custo operacional (TIBURTIUS et al., 2004).

Os processos de biorremediação realizados in-situ, são realizados no local onde houve a contaminação. Já nos processos ex-situ, o meio contaminado é extraído e tratado em instalações de depuração específica. Usualmente, as técnicas de biorremediação consistem na bioestimulação, ou seja, na adição de nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo) e ajuste das condições ambientais (pH, temperatura, umidade, aeração, etc.), favorecendo o desenvolvimento da microbiota autóctone (MACIEL, 2004; RAMSAY et al., 2000). Ou ainda, pela técnica conhecida como bioaugmentação, que consiste na adição de microrganismos com a capacidade de degradar os contaminantes específicos rapidamente (MACIEL, 2004). Assim, pode-se definir biorremediação como um processo que explora a diversidade e versatilidade metabólica dos microrganismos na transformação dos contaminantes químicos em produtos menos tóxicos. Deve ainda, oferecer vantagens significativas sobre outros métodos de tratamento, uma vez que os custos devem ser reduzidos e a poluição local deve ser mínima (TORSVIK et al., 1990).

A capacidade dos microrganismos para transformar formas de matéria orgânica (natural ou sintética) faz deles excelentes agentes para a biorremediação. Sendo assim, faz-se necessário o estudo para a atenuação de hidrocarbonetos e o

desenvolvimento de técnicas simples e economicamente viáveis para acelerar a aplicação da biorremediação (SANTOS, 2004).

Para a biorremediação em ambientes marinhos são utilizados dois tratamentos: (i) a modificação ambiental, como a aeração ou aplicação de nutrientes, como nitrogênio, fósforo e potássio (NPK), visando o aumento da capacidade de degradação bactérias indígenas degradadoras de hidrocarbonetos; e (ii) a introdução de bactérias exógenas degradadoras de hidrocarbonetos selecionadas para a biorremediação (ATLAS, 1995). A adição de nutrientes tem sido um método eficaz de aumentar a biodegradação de hidrocarbonetos pela microbiota indígena. Uma maior estimulação pode ser obtida por adição de maiores níveis de nutrientes, no entanto, isto pode proporcionar riscos ecológicos e efeitos locais, como a toxicidade para a vida marinha e a eutrofização associada ao bloom de algas (ATLAS, 1995). Uma alternativa é o uso dos biossurfactantes que são considerados como uma classe única de compostos que apresentam um grande potencial de aplicações além da indústria petroquímica como aditivos cosméticos e controle biológico (DESAI & BANAT, 1997; STANGHELLINI & MILLER 1997).

Os biossurfactantes consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras, principalmente os degradadores de hidrocarbonetos (NITSCHKE & PASTORE, 2002), possuindo características de detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases (MANIASSO, 2001; DESAI & BANAT, 1997). Estes compostos podem ser utilizados na recuperação avançada de petróleo (MEOR), na limpeza de tanques, na dispersão de manchas de óleo, na biorremediação de ambientes contaminados com poluentes

hidrofóbicos, já que são capazes de solubilizar compostos oleosos (GRISHCHENKOV et al., 1999).

Dentre as vantagens do uso de biossurfactantes, pode-se destacar a baixa toxicidade, alta degradabilidade, tolerância à temperatura, pH e salinidade, alta atividade espumante, excelente atividade interfacial e superficial e capacidade de modificação estrutural através da engenharia genética ou técnicas bioquímicas (DESAI & BANAT, 1997; MAKKAR & CAMEOTRA, 2002; NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Visando a detecção da produção de biossurfactantes, pode-se aplicar o teste do colapso da gota que constitui uma técnica rápida, prática e reproduzível (YOUSSEF et al., 2004). Neste método, uma pequena quantidade de água aplicada sobre um composto hidrofóbico, na ausência de surfactantes, formará uma gota, pois a molécula polar da água é repelida pela superfície hidrofóbica. No entanto, se for aplicado um surfactante a esta suspensão, a tensão interfacial é reduzida, resultando na dispersão (colapso) da gota de água na superfície hidrofóbica. Baseado neste princípio, o teste de colapso da gota é utilizado na seleção de microrganismos potenciais produtores de biossurfactantes (BODOUR & MILLER-MAIER, 1998).

1.4- Vias metabólicas para a degradação aeróbia de compostos aromáticos

Por milhões de anos a biossíntese e a quebra de anéis aromáticos têm sido uma parte importante do ciclo global do carbono (BUGG & WINFIELD, 1998). Os tecidos de plantas e árvores são compostos principalmente por celulose e lignina, este último, é um material polimérico heterogêneo, contendo anéis fenólicos aromáticos, ligados a três carbonos alifáticos unidos (Figura 4).

Estima-se que sejam convertidas $1,5 \times 10^{10}$ tons de CO_2 anualmente nas florestas, e que 18 a 35% deste, em peso seco, seja lignina. A quebra da celulose e da lignina é feita unicamente por microrganismos, demonstrando claramente a significância global da biodegradação de compostos aromáticos (BUGG & WINFIELD, 1998).

Com o início da era industrial, aumentaram rapidamente a quantidade de compostos aromáticos manipulados pelo homem, que têm sido introduzidos no ambiente, por exemplo, os pesticidas, detergentes, óleos, tintas, solventes e explosivos. Muitos destes compostos podem ser rápida e prontamente degradados por microrganismos usando as mesmas enzimas aplicadas na degradação de compostos de ocorrência natural. Porém, um grande número destes produtos químicos não-naturais, ou xenobióticos, não são completamente degradados por microrganismos, ou o são muito lentamente, persistindo assim, no ambiente (BUGG & WINFIELD, 1998).

Fonte: www.atmosphere.mpg

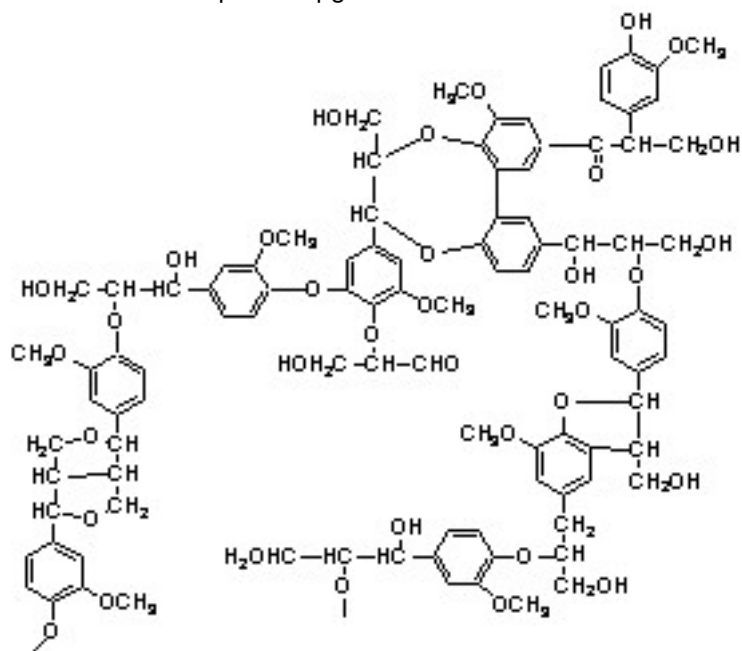


Figura 4: Estrutura química da lignina

Há duas estratégias usadas por microrganismos para quebrar anéis aromáticos: (i) por bactérias aeróbias, através da oxidação do anel para um componente dihidroxiaromático (um catecol ou uma hidroquinona), e posteriormente, pela clivagem oxidativa do anel; (ii) por bactérias anaeróbias, pela hidrogenação redutiva do anel, seguida da fragmentação do anel (BUGG & WINFIELD, 1998; DAGLEY, 1975; HIGUCHI, 1981).

Muitos componentes aromáticos simples, como o benzeno, tolueno, xilenos, ácido benzóico, ácido fenilacético e ácido fenilpropiónico, são degradados por

bactérias aeróbias do solo, como *Pseudomonas*, *Acinetobacter* (Gram negativas) e *Rhodococcus* (Gram positiva) (DAGLEY, 1975). Os últimos dois componentes são também degradados por *Escherichia coli* (Gram negativa). As vias catabólicas usadas por estas bactérias são oxidativas, pela hidroxilação do anel para gerar o catecol, que é o intermediário das vias subseqüentes (BUGG & WINFIELD, 1998).

Em geral, as vias metabólicas bacterianas de degradação aeróbia de hidrocarbonetos aromáticos podem ser divididas em três partes. Primeiro, o substrato aromático é transformado em um metabólito di-hidroxiaromático (tipicamente um catecol) (Figura 5) através da introdução de grupos hidroxila por mono ou di-oxigenases (SCRAMIN et al., 2003; KANALY & HARAYAMA, 2000; BUGG & WINFIELD, 1998).

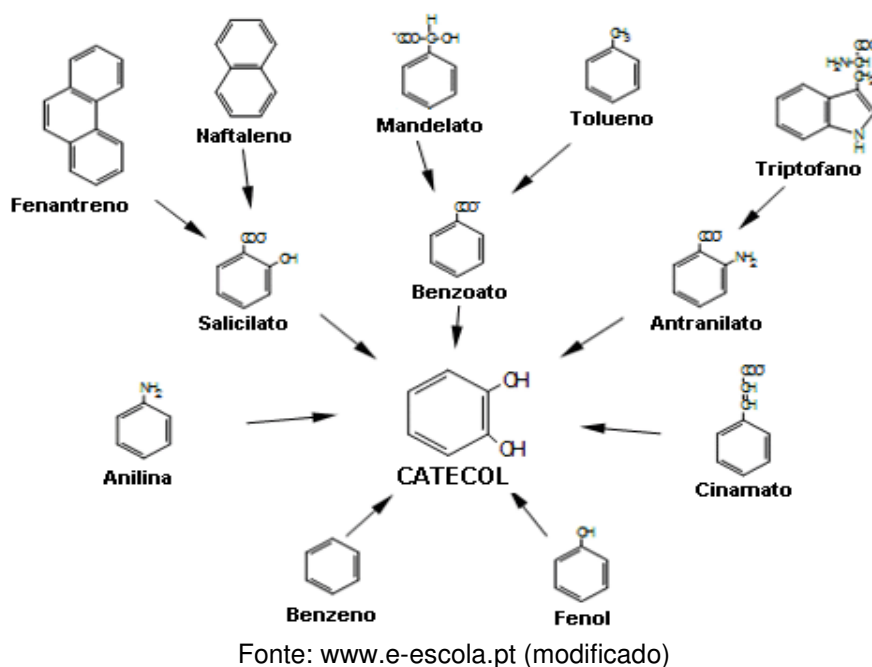
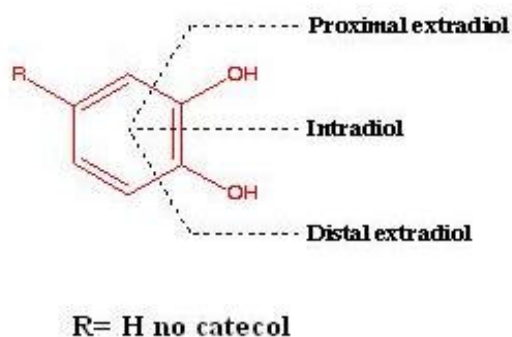


Figura 5: Transformação de compostos aromáticos em catecol.

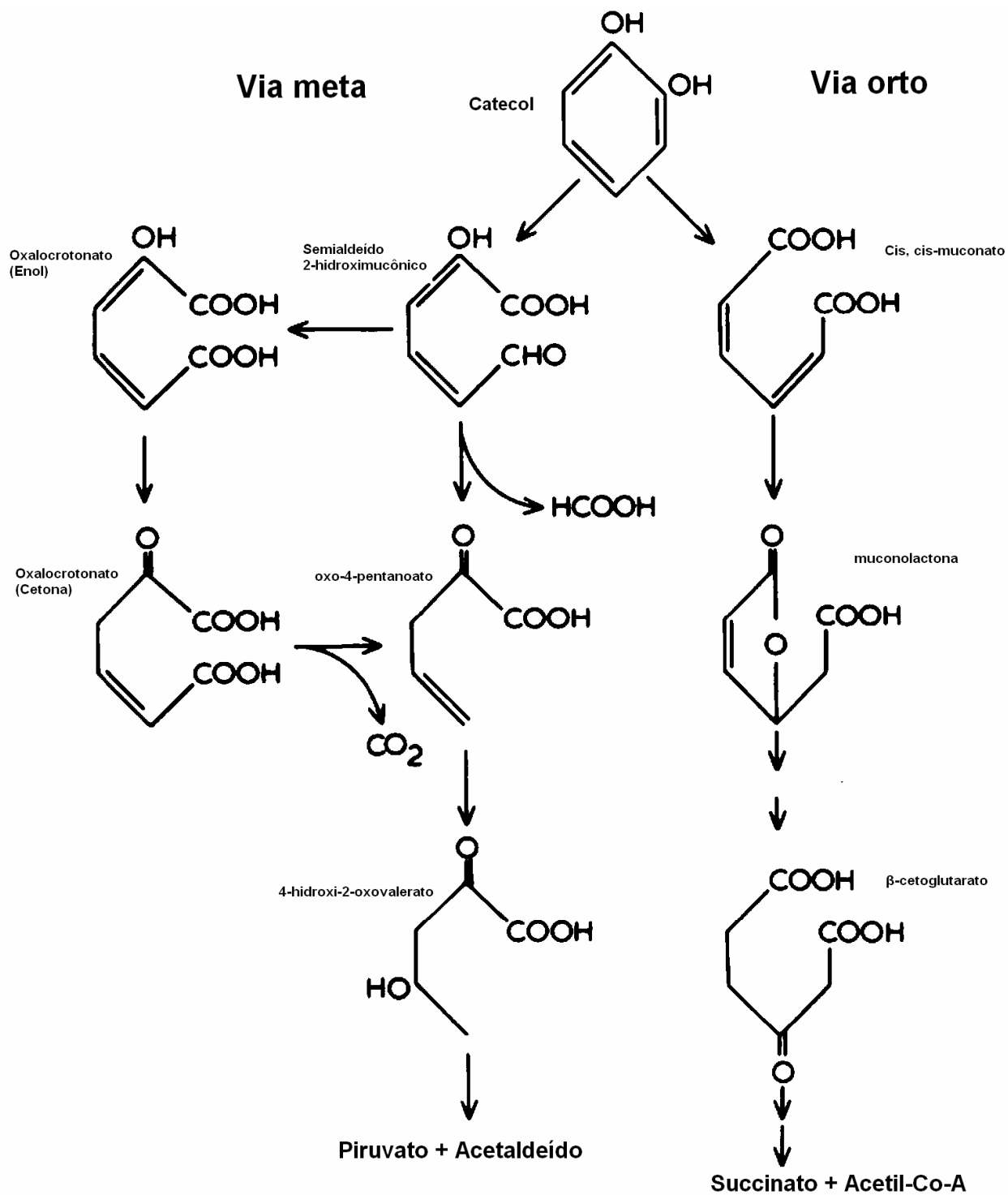
A segunda fase consiste na abertura do anel do catecol por di-oxigenases, que catalisam a adição de oxigênio molecular ao anel, quebrando assim uma das ligações carbono-carbono. A quebra do anel pode ocorrer em duas posições distintas (Figura 6): entre os grupos hidroxila (clivagem intradiol ou orto), ou adjacente a um dos grupos hidroxila (clivagem extradiol ou meta) (SCRAMIN et al., 2003; KANALY & HARAYAMA, 2000; BUGG & WINFIELD, 1998). As di-oxigenases que fazem a orto-clivagem (adição intradiol), como a catecol 1,2-di-oxigenase, são enzimas cujo cofator é o Fe^{3+} e produzem o ácido cis-cis-mucônico. Enquanto as di-oxigenases que fazem a meta-clivagem (adição extradiol), são enzimas dependentes do Fe^{2+} e produzem o semialdeído 2-hidroxi-mucônico, podem ser subdivididas em proximais e distais extradiol dioxigenases, para caracterizar a posição da clivagem do anel em relação ao radical. A catecol 2,3-di-oxigenase é um exemplo de enzima que atua na meta-clivagem do catecol (SCRAMIN et al., 2003; KANALY & HARAYAMA, 2000; BUGG & WINFIELD, 1998).



Fonte: www.cbs.umn.edu (modificado)

Figura 6: Clivagem extradiol proximal e distal, e intradiol do anel do catecol por dioxigenases.

Na última fase do catabolismo dos hidrocarbonetos aromáticos, o produto resultante da abertura do anel é convertido em intermediários do metabolismo central (acetil-Co-A, oxalacetato e piruvato, por exemplo) (KANALY & HARAYAMA, 2000; SCRAMIN et al., 2003). A segunda e a terceira fases podem ser observadas na Figura 7.



Fonte: MURRAY & WILLIAMS, 1974 (modificado)

Figura 7: Representação da degradação do catecol pelas vias meta e orto.

1.5- Estudo da diversidade microbiana

Os microrganismos são encontrados em uma vasta diversidade de ambientes, desempenhando importantes papéis na natureza. Em termos de habitat, os microrganismos são encontrados em quase todos os ambientes, tanto no solo, como na água, ar e subsolo. Incluindo ambientes hostis, como em altas temperaturas, altas concentrações de salinidade e condições de pH muito ácidos ou básicos. Em termos metabólicos, temos também os mais variados tipos, como aqueles que são capazes de produzir ácido sulfúrico, ou aqueles capazes de degradar compostos complexos como cânfora, herbicidas, petróleo, tintas, solventes etc. (KYAW, in: <http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/intromicro/intromicro.html#ubiquidade>).

Além de seu essencial papel como componentes da microbiota residente de animais e plantas, os microrganismos são responsáveis pela produção de inúmeros produtos, tais como: vinhos, cervejas, queijos, pickles, vinagre, antibióticos, pães, etc. Devendo ser enfatizada a sua importância em processos biotecnológicos, como a biorremediação e a engenharia genética (KYAW, in: <http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/intromicro/intromicro.html#ubiquidade>).

O estudo da diversidade microbiana aborda questões sobre a composição, estrutura e equilíbrio ecológico dessas comunidades, além de buscar o entendimento sobre a atividade e função das espécies que as compõem (GIOVANNONI et al., 1990, TORVISK et al., 1990). Os métodos tradicionais de classificação microbiana, baseados na morfologia e fisiologia, podem não representar o comportamento

microbiano que ocorre no ambiente natural, pois a mesma linhagem pode revelar diferentes características quando cultivada em laboratório (COUTINHO et al., 1999). Além disso, diversas pesquisas têm demonstrado que a maior parte dos microrganismos encontrados em amostras ambientais não pode ser isolada pelos métodos tradicionais de cultivo (ROOSE-AMSALEG et al., 2001). Estima-se que foram descobertas e nomeadas até o momento, talvez, menos de 0,1% e no máximo 10% das espécies microbianas, dependendo do hábitat estudado (ZILLI et al., 2003).

A maioria dos estudos de ecologia microbiana são feitos com microrganismos cultiváveis (CURY, 2002; ZILLI et al., 2003). Avanços em técnicas de biologia molecular têm auxiliado os pesquisadores a conhecerem melhor a ecologia das comunidades microbianas em sistemas naturais, e os impactos da poluição de origem antrópica sobre estas comunidades, através de análises de microrganismos retirados diretamente de meios naturais, sem a necessidade prévia de cultura e isolamento das células (CURY, 2002; MACIEL, 2004).

O uso de 16S rDNA tem grande significância na identificação e análise filogenética de bactérias, uma vez que este gene é estável ao longo do tempo, e específico para a classificação ao nível de espécie. Entre as técnicas moleculares para este tipo de estudo, destaca-se o DGGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante), que fornece um perfil da diversidade microbiana da amostra ambiental, no qual, podem-se conhecer os microrganismos cultiváveis e não cultiváveis (CURY, 2002; ZILLI et al., 2003).

Para que tais análises possam ser realizadas, o DNA precisa ser isolado (COUTINHO et al., 1999; ROOSE-AMSALEG et al., 2001). Os métodos descritos

para a extração de DNA total de solo são baseados em dois princípios, o primeiro é a extração do DNA celular após o isolamento das células microbianas presentes na amostra; o outro é caracterizado pela lise direta de todo o material presente no solo. O segundo método é o mais utilizado por ser mais representativo sobre a comunidade microbiana total (ROOSE-AMSALEG et al., 2001).

A lise celular costuma ser uma etapa crítica na extração do DNA, tendo por finalidade o rompimento de um maior número de células, para que os ácidos nucléicos sejam liberados em solução. Este procedimento pode ser realizado combinando métodos físicos, químicos e enzimáticos (ROOSE-AMSALEG et al., 2001; COUTINHO et al., 1999).

O processo de extração de DNA através da lise direta requer alguns procedimentos básicos, que se encontram resumidos na Tabela 1.

Tabela 1: Principais tratamentos e suas funções na extração do DNA microbiano total de solo para o estudo da diversidade microbiana. Fonte: MACIEL, 2004.

Tratamento	Reagente / Processo	Função
1- Lise		
Objetivo: Romper a parede e membranas celulares, liberando o DNA no meio. Pode ser:		
- Física	- Choque térmico; sonicação; fervura; bead-beating; maceração com N ₂ ; etc.	Promover ao rompimento da parede e membrana celular através de forças mecânicas.
- Química	- Detergentes: dodecil sulfato de sódio (SDS); triton 114; sarcosil; brometo de N-cetil-N,N,N-trimetilamônio (CTAB).	Dissolver os lipídeos de membrana, solubilizar, dissociar e desnaturar proteínas, inibir a ação de nucleases.
- Enzimática	- Proteases (proteínase K) e Lisozimas.	Desnaturar as proteínas de parede e membrana celular e hidrólise do muropéptido.
2- Separação do DNA		
Objetivo: Separação do DNA dos demais componentes celulares.		
	- Solventes orgânicos: fenol; fenol-clorofórmio; clorofórmio-álcool isoamílico.	Desnaturar proteínas e separar o DNA devido à formação de três fases: orgânica, intermediária (contendo as proteínas desnaturadas) e aquosa superficial (contendo o DNA).
	- Tiocianato de guanidina	Agente caotrópico que realiza pontes de H com as moléculas de água, causando desestabilização das ligações entre as proteínas solúveis no meio e a água.
3- Precipitação do DNA		
Objetivo: Precipitação do DNA para ser ressuspenso em menor volume de água ou tampão, concentrando a amostra.		
	- Precipitação alcoólica: etanol; isopropanol.	Retirar as moléculas de água das hélices do DNA, provocando sua precipitação.
	- Precipitação com sal: acetato de sódio; acetato de amônio.	Neutralizar as cargas negativas (fosfato) do DNA, promovendo sua agregação.

Tratamento	Reagente / Processo	Função
	- Polietilenoglicol (PEG).	Reduzir o poder de solubilização da água.
4- Purificação		
Objetivo: Remoção de ácido húmico e fúlvico, matéria orgânica, endonucleases e demais inibidores da taq DNA polimerase.	- Polivinilpirrolidona (PVP); Polivinilpolipirrolidona (PVPP)	Adsorver compostos fenólicos e húmicos através das pontes de H entre estes compostos.
	- Cromatografia de filtração em gel.	Purificar o DNA através da utilização de colunas contendo resinas, devido à passagem das moléculas menores através dos poros da coluna.
	- Cromatografia de adsorção	Purificar o ácido nucléico após a adsorção do DNA por uma matriz de carga positiva, através da utilização de colunas aniônicas.

Estudar a composição microbiana de manguezais, usando técnicas de isolamento e/ou moleculares, consiste em uma maneira de conhecer a diversidade metabólica das comunidades de microrganismos, e ainda avaliar o impacto da ação antrópica nesses ecossistemas. Neste estudo, membros da comunidade microbiana presente em um manguezal do sul da Bahia foram investigados quanto à capacidade de reagirem perante a contaminação por petróleo. Para tanto, realizou-se experimentos para verificar se estes microrganismos são capazes de mineralizar compostos orgânicos aromáticos a CO₂ e H₂O. A partir dos resultados obtidos, neste estudo pretende-se, futuramente, avaliar os possíveis efeitos do petróleo sobre a comunidade microbiana do sedimento de manguezal; e ainda, selecionar microrganismos com atributos de interesse biotecnológico.

2 - OBJETIVOS

2.1- Geral:

- Verificar a potencialidade dos microrganismos para a biodegradação de compostos do petróleo em um manguezal do município de Una - Bahia, Brasil.

2.2- Específicos:

- Isolar microrganismos que utilizem petróleo como única fonte de carbono a partir do ambiente;
- Testar a capacidade de produção de biossurfactantes dos microrganismos isolados a partir do sedimento do manguezal;
- Testar a capacidade dos microrganismos isolados utilizarem BTX (benzeno, tolueno e xileno) com única fonte de carbono e determinar a via metabólica para a degradação de hidrocarbonetos através de clivagem de catecol;
- Padronizar um protocolo de extração de DNA e PCR das bactérias isoladas.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Área de estudo - A área escolhida para este estudo foi o manguezal do Acuípe, localizado no município de Una (Bahia) (Figura 8), uma vez que este manguezal não apresenta histórico de contaminação por petróleo.

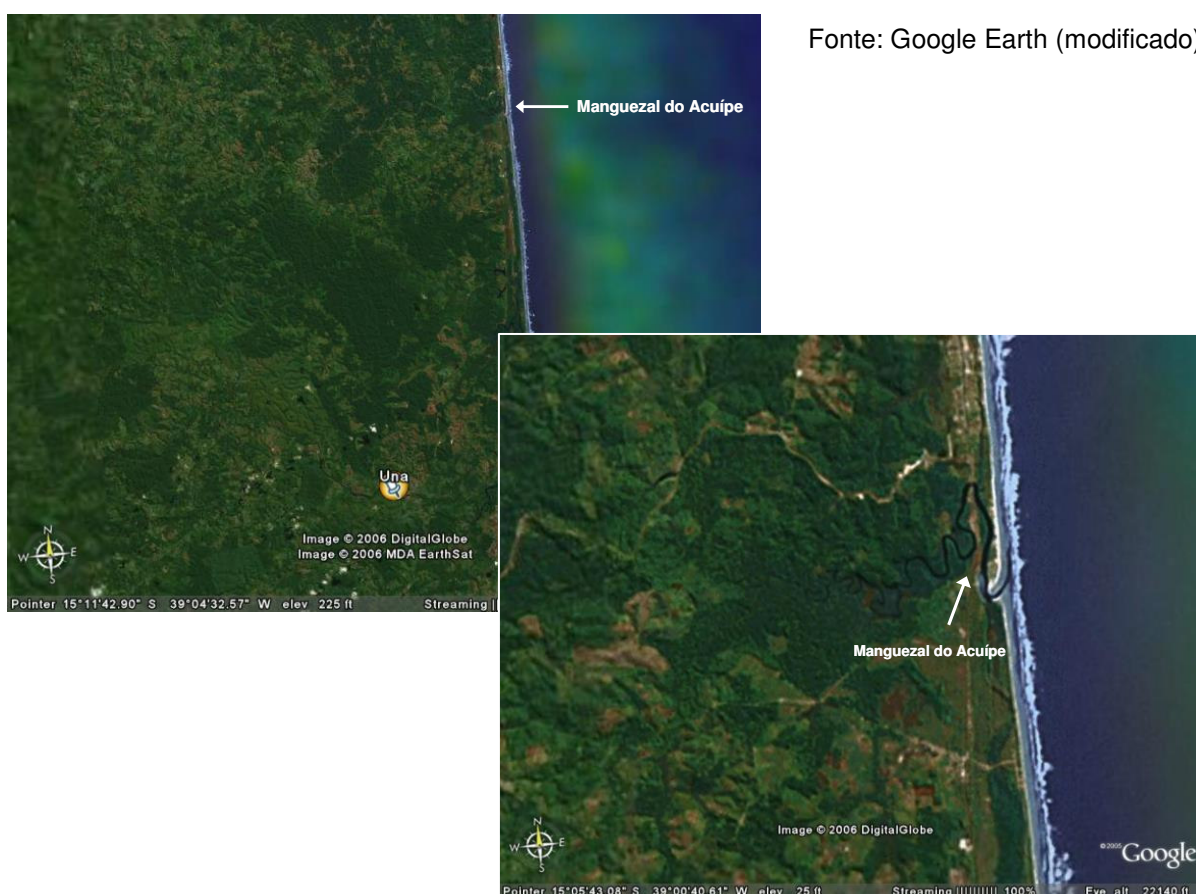


Figura 8: Manguezal do Acuípe e município de Una.

O município de Una ($15^{\circ}17' S$ e $39^{\circ}04' W$), fundado no ano de 1924, situa-se na micro-região Ilhéus-Itabuna, e possui a área total de $1.163,5 \text{ Km}^2$, com uma altitude de 28 m e uma população de 34.960 habitantes

(<http://www.citybrazil.com.br/ba/una/>). Una faz divisa com as cidades de Ilhéus (ao norte) e Canavieiras (ao sul), apresentando uma temperatura média anual de aproximadamente 24° C com clima quente e úmido sem estação seca definida (<http://www.citybrazil.com.br/ba/regioes/ilheusitabuna/>). A localização do município de Una é demonstrada na Figura 9.

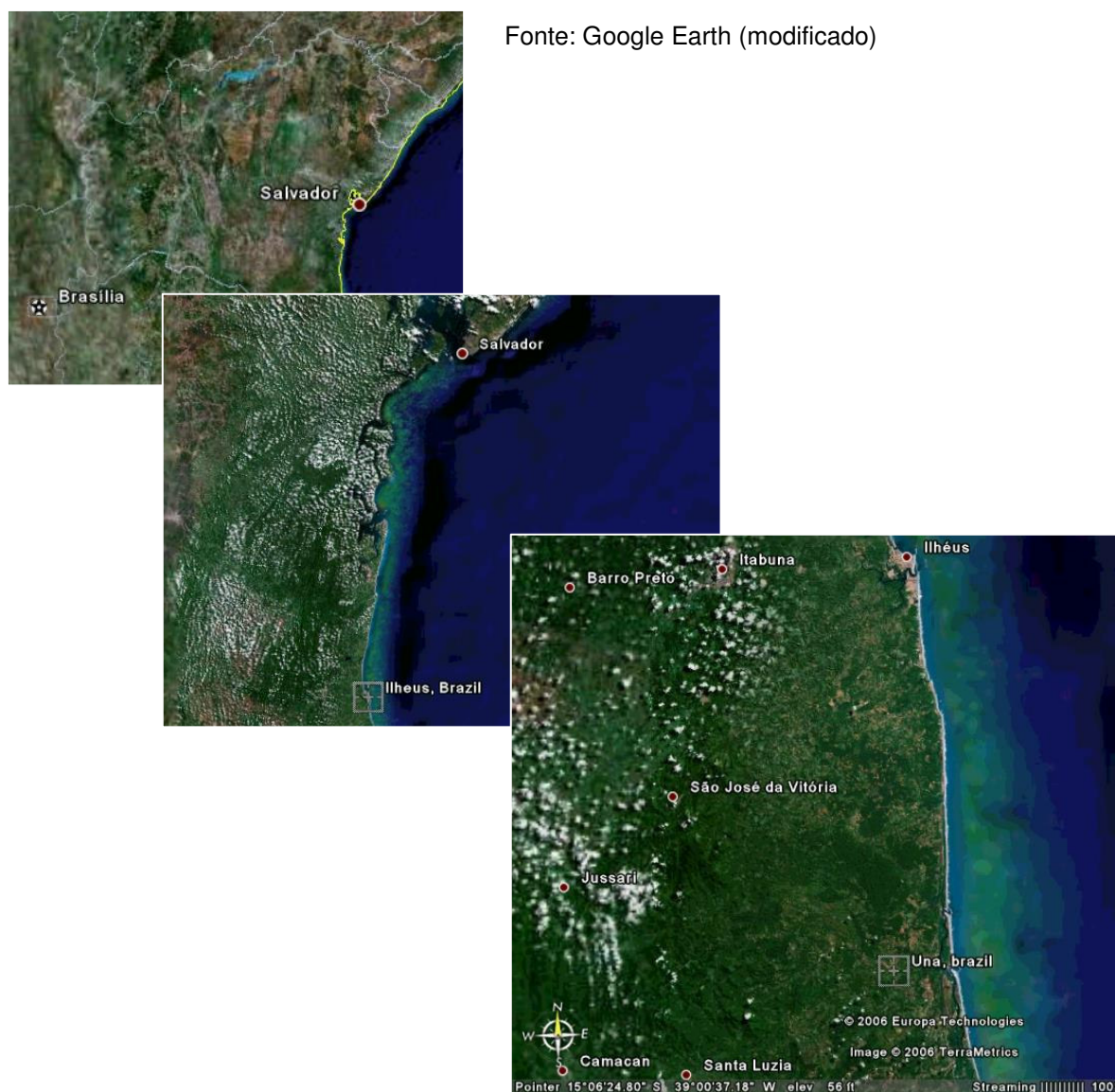


Figura 9: Localização do município de Una.

3.2 - Coleta da amostra- A coleta do sedimento foi realizada no mês de maio de 2005, no manguezal do Acuípe – Una (BA). A amostra composta, de aproximadamente 1000g, foi coletada a partir da camada superficial de sedimento (de 0 a 10 cm), em seis pontos do manguezal. A seguir, foi colocada em recipientes de vidro estéreis com o auxílio de uma espátula e transportada em caixa de isopor contendo gelo para o laboratório de Monitoramento Ambiental da UESC (Universidade Estadual de Santa Cruz) onde foi processada imediatamente, sendo analisada em dois tratamentos.

Os locais amostrados foram escolhidos de acordo com a maré do dia da coleta, pois o sedimento não poderia estar coberto por água no momento da amostragem; e pelo seu grau de representatividade do manguezal (foi escolhido o local que mais se assemelhava ao restante do sistema).

3.3 – Experimento de contagem microbiana e seleção de microrganismos degradadores de petróleo

3.3.1 - Tratamento 1 – O sedimento coletado foi homogeneizado com uma espátula estéril. A seguir, cinco gramas da amostra foram inoculados em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 45mL de solução tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7,0. O frasco foi incubado à temperatura ambiente sob agitação a 200 rpm por 3 semanas. No momento inicial, e nos dias cinco, dez, quinze e vinte de incubação, retirou-se alíquotas que foram diluídas serialmente (de 10^{-1} a 10^{-8}) e inoculados 100 μ L de cada diluição em duplicata em placas com meio de cultura para

heterotróficos totais (LI et al., 2000) pH 7,0 (extrato de carne 3 – 5 g/L; peptona 10 g/L; NaCl 5 g/L; ágar bacteriológico 25 g/L) e em meio mínimo mineral (K_2HPO_4 0,1%; KH_2PO_4 0,1%; NH_4Cl , 0,1%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05%, $CaCl_2$ 0,001%, $FeSO_4$ 0,001%) contendo 0,5% (V/V) de petróleo como única fonte de carbono e 1,5% de ágar bacteriológico como agente solidificante (LI et al., 2000 modificado). As placas foram, então, incubadas a 30° C e a contagem foi realizada após 48 horas de incubação (Figura 10).

3.3.2 - Tratamento 2- Dez gramas do sedimento foram inoculados em um frasco Erlenmeyer de 250 mL com 90 mL de uma solução de meio mínimo mineral contendo 2% de petróleo, que corresponde em condições naturais a um derrame de petróleo de porte médio, e mantido sob agitação a 200 rpm à temperatura ambiente ($\pm 28^\circ C$). Em intervalos de aproximadamente 30 dias, foi adicionado meio mínimo mineral como suprimento de nutrientes (nitrogênio, fósforo e potássio) para os microrganismos, e quando o petróleo foi visualmente degradado, foi adicionado mais 2% de petróleo à solução como única fonte de carbono. Após cinco meses de incubação, a solução foi centrifugada e então se repetiu o procedimento realizado no tratamento 1 (Figura 10).

3.3.3 – Análise estatística – Utilizou-se o pacote estatístico Statistica 5.0 para a análise dos resultados. Foi feita uma análise de variância (ANOVA *two way*), com o teste de Tukey como um pós-teste para avaliar a influência do tipo de meio de cultura

utilizado e da presença ou ausência do petróleo no sedimento sobre a contagem de microrganismos nas placas.

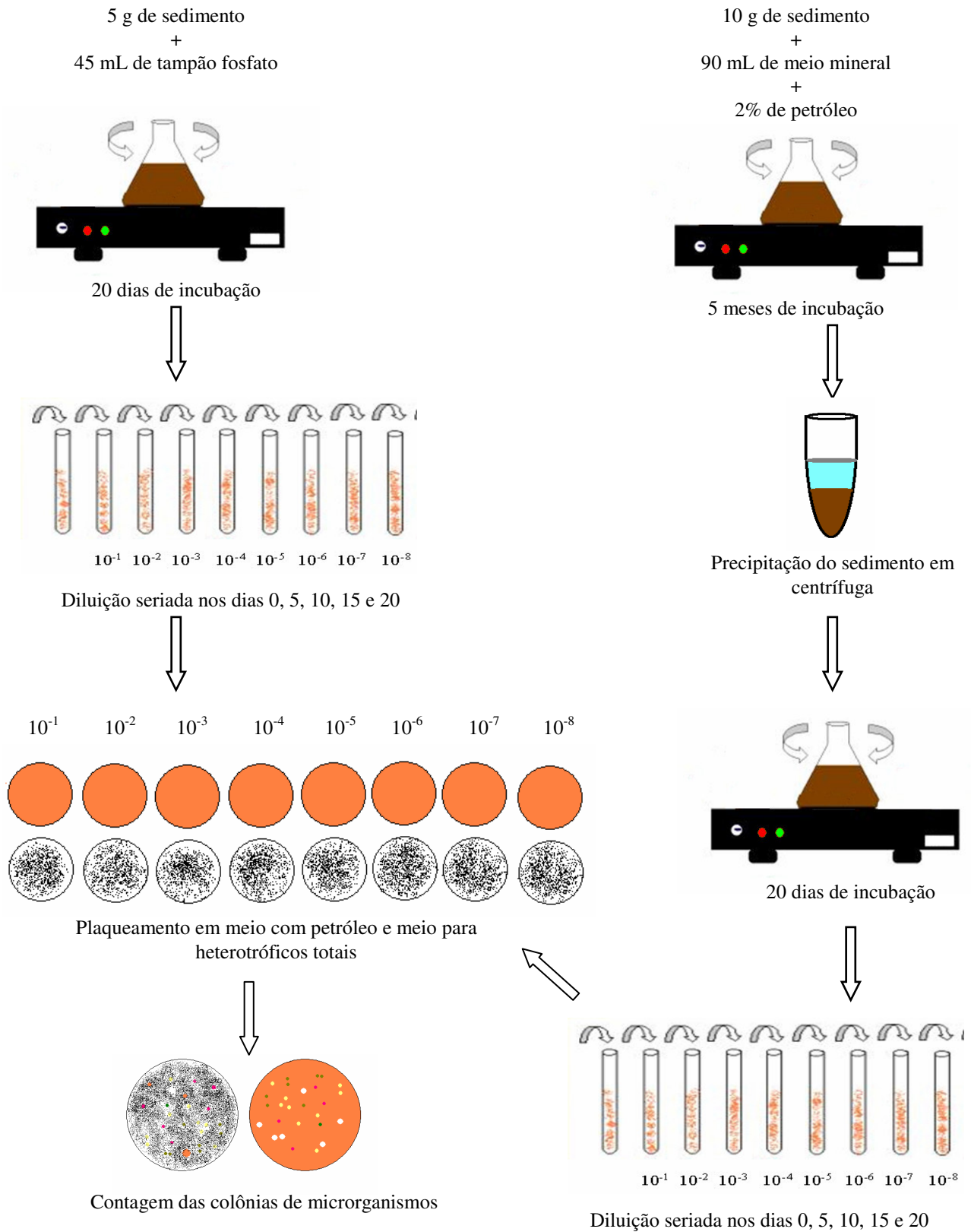


Figura 10: Esquema do experimento de contagem microbiana.

3.4- Manutenção dos microrganismos - Após a contagem, os microrganismos que cresceram nas placas com petróleo em ambos os tratamentos, foram isolados em placas com ágar nutriente. A seguir, as colônias isoladas foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio TSB (Triple Soy Broth), após o crescimento em estufa a 30° C, 1 mL das soluções microbianas foram transferidos para Eppendorfs com 20% de glicerol e estocados em congelador a -20° C (Figura 11).

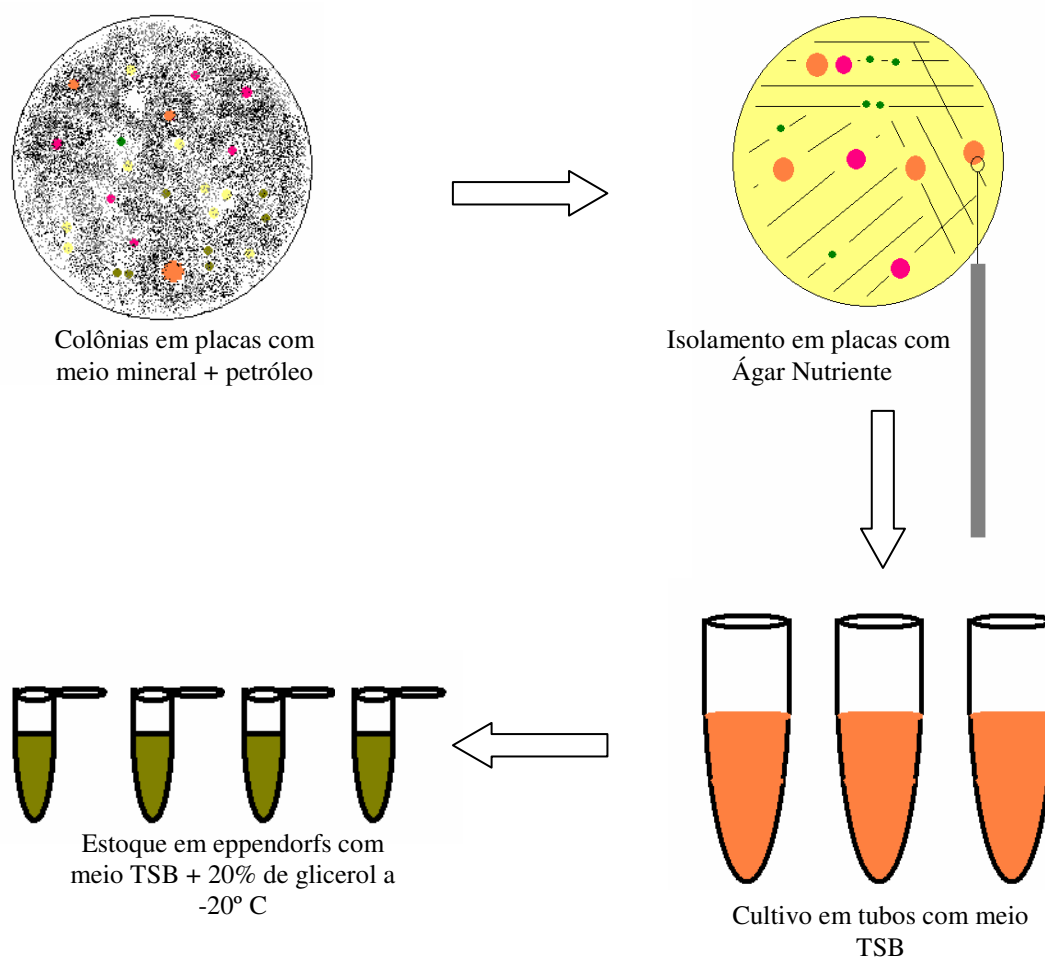


Figura 11: Esquema do procedimento de manutenção dos microrganismos.

3.5- Análise da produção de CO₂ no sedimento – 100g do sedimento sem adição de petróleo foram misturados com 50 mL de meio mineral, e igual quantidade do sedimento com adição de petróleo foi acrescida de 49 mL de meio mineral e 1 mL de petróleo, ambos foram inoculados em duplicata em frascos biométricos de Bartha (Figura 12), contendo 10 mL de NaOH (0,1 N), o qual, reage em presença de CO₂ produzido no sedimento, formando NaHCO₃ (Figura 13). Foi feita a titulação com HCl (0,1 N) da solução incubada inicialmente no tubo. Após a titulação, o NaOH foi renovado, e após 3 dias de incubação à temperatura ambiente, efetuada uma nova titulação, repetindo-se este procedimento seis vezes (18 dias de incubação).

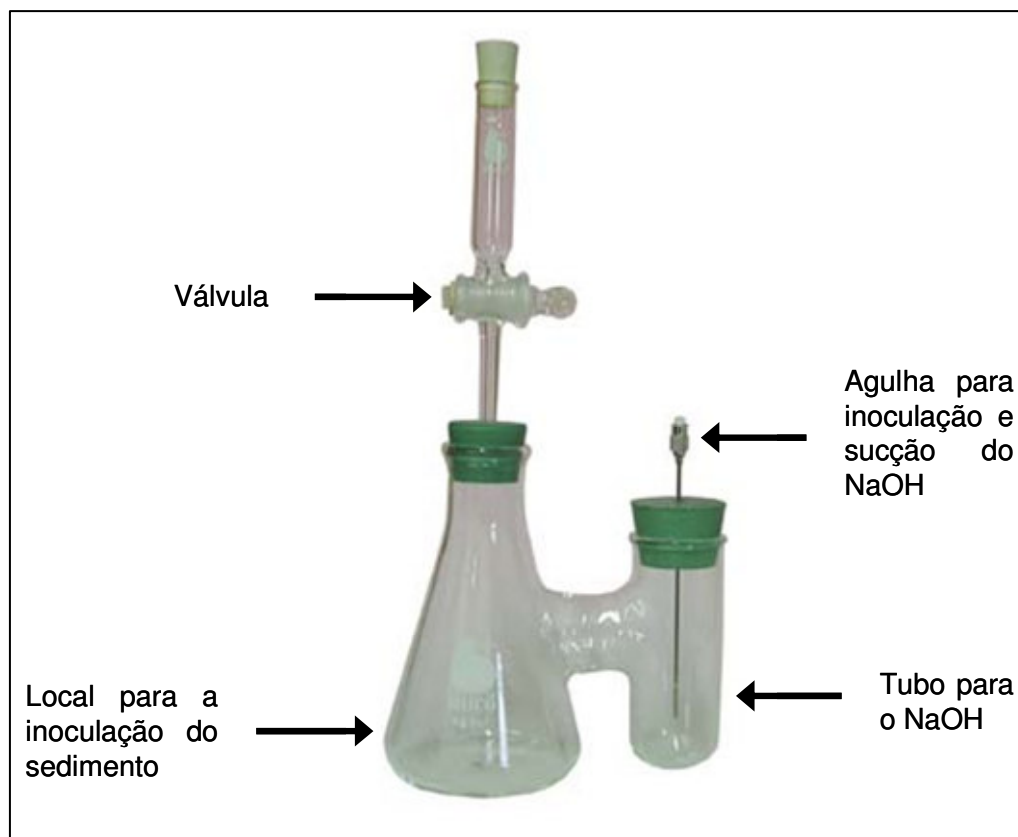


Figura 12: Frasco biométrico para análise da produção de CO₂.

O branco foi preparado usando apenas NaOH e HCl. Foram medidas a quantidade inicial e final do HCl na coluna de titulação, e a partir destes dados, foi calculada a quantidade de CO₂ produzida, utilizando a seguinte equação (IBAMA, 1990):

$$\text{mg de C (CO}_2\text{)} = [(\text{mL de HCl gasto branco}) - (\text{mL de HCl gasto amostra})] \times N \times 22$$

Onde:

N= normalidade do HCL

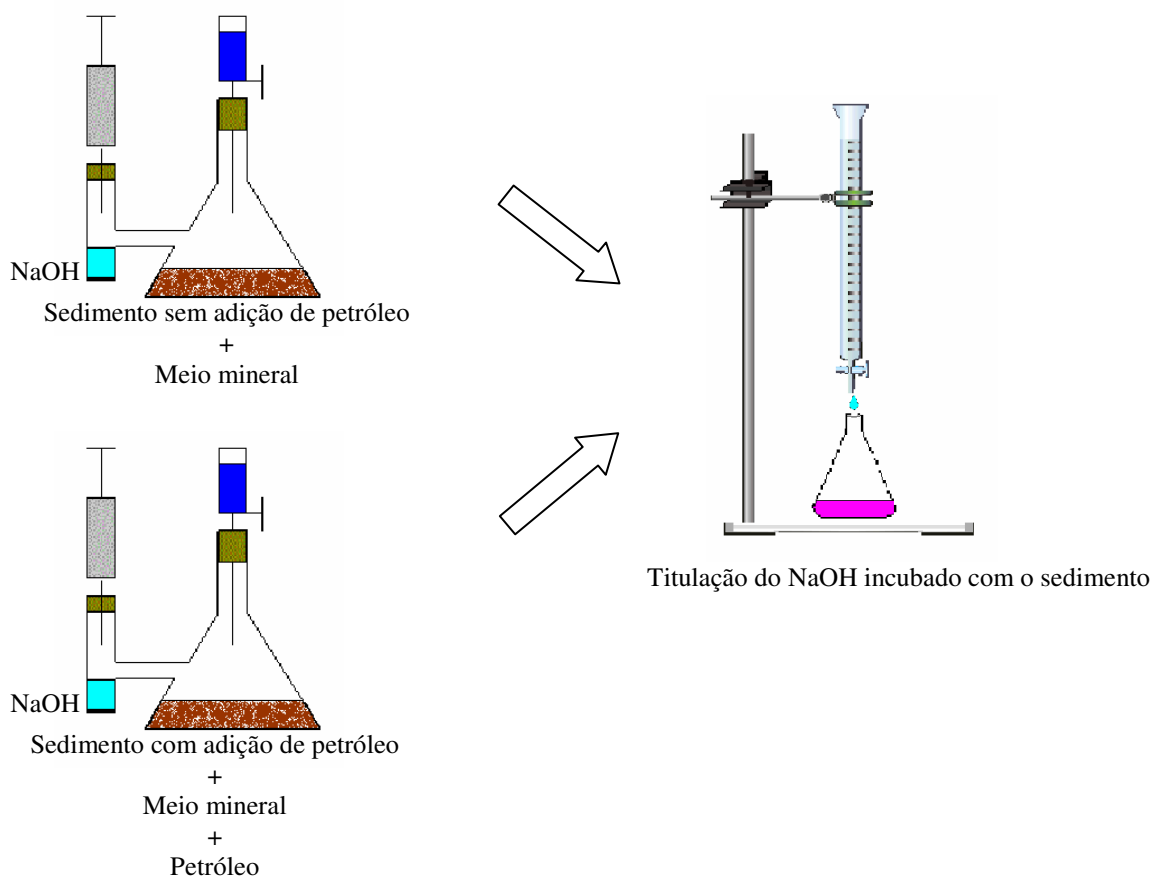


Figura 13: Esquema do experimento de produção de CO₂.

3.6 - Padronização dos inóculos - Para a padronização dos inóculos utilizados nos testes de *screening* em BTX e clivagem do catecol, 10 µL de cada solução do estoque foram transferidos para tubos de ensaio com 3 mL de meio mínimo mineral com BTX (30 mM). Para a padronização dos inóculos a serem utilizados no teste de produção de biossurfactantes, 1% de glicose foram adicionados a tubos com 3 mL de meio mineral, inoculando-se 10 µL de cada solução do estoque. Os tubos foram incubados a 30° C por 72 h, a seguir, foram padronizados pelo cartão de Wickerham (Figura 14), que consiste em um cartão com três linhas pretas, que servem de referência na estimativa da concentração celular em uma suspensão microbiana. A avaliação foi feita de forma comparativa em uma escala de 0 a 3, onde 0 significa poucas células com as linhas pretas totalmente visíveis; 1 significa densidade fraca, com linhas visíveis, porém um pouco embaçadas; 2 significa densidade média, com linhas visíveis, porém embaçadas e difusas e, finalmente 3, que representa uma densidade forte, onde não se pode ver as linhas. Foram considerados positivos os tubos com densidade 2 ou 3, diluindo-se os tubos com densidade 3, padronizando-se assim todos os inóculos para densidade 2 (TOSTA, 2004).

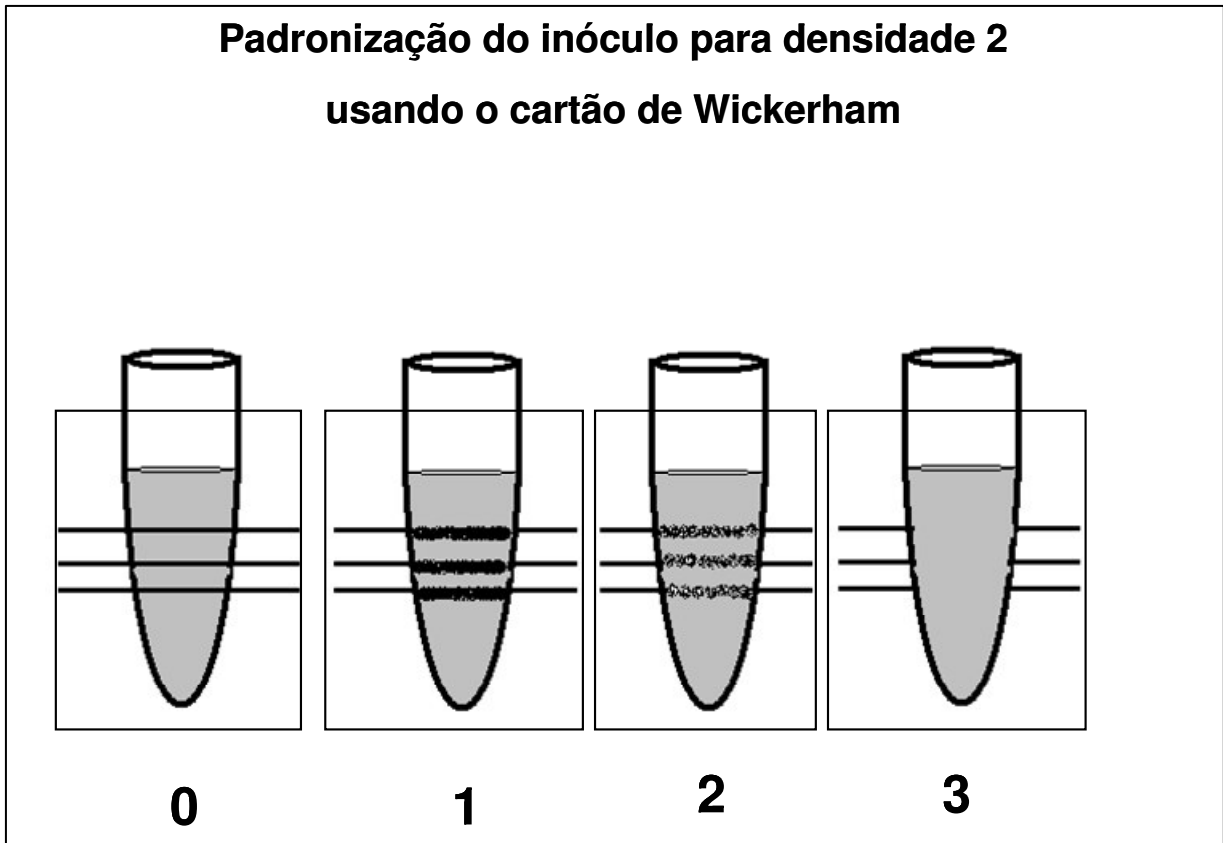


Fig 14: Esquema ilustrativo da padronização de inóculos com o cartão de Wickerham.

3.7- Análise qualitativa para produção de biossurfactantes – De acordo com YOUSSEF et al. (2004), foram utilizadas duas fontes de carbono para a verificação da produção de biossurfactantes (Figura 15).

3.7.1 - BTX (benzeno, tolueno e xileno) como fonte de carbono - 500 μL de cada inóculo foram colocados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 9,5 mL de meio mínimo mineral contendo BTX 30 mM. As culturas foram incubadas sob agitação constante a 200 rpm por cinco dias à temperatura ambiente.

3.7.2 - Glicose como fonte de carbono - 500 μL de cada inóculo foram colocados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 9,5 mL de meio mínimo mineral contendo glicose 2%. As culturas foram incubadas sob agitação constante a 200 rpm por cinco dias à temperatura ambiente.

3.7.3 - Produção de biossurfactantes - 5 μL de suspensão microbiana obtida de cada amostra foram inoculadas separadamente em "poços" de placas de ELISA previamente preenchidos com 1,8 μL de óleo mineral. Após 1 minuto de reação o resultado foi determinado visualmente. Quando houve o colapso da gota de óleo mineral o resultado foi considerado positivo. O controle foi preparado utilizando-se SDS (dodecil sulfato de sódio) no lugar das amostras.

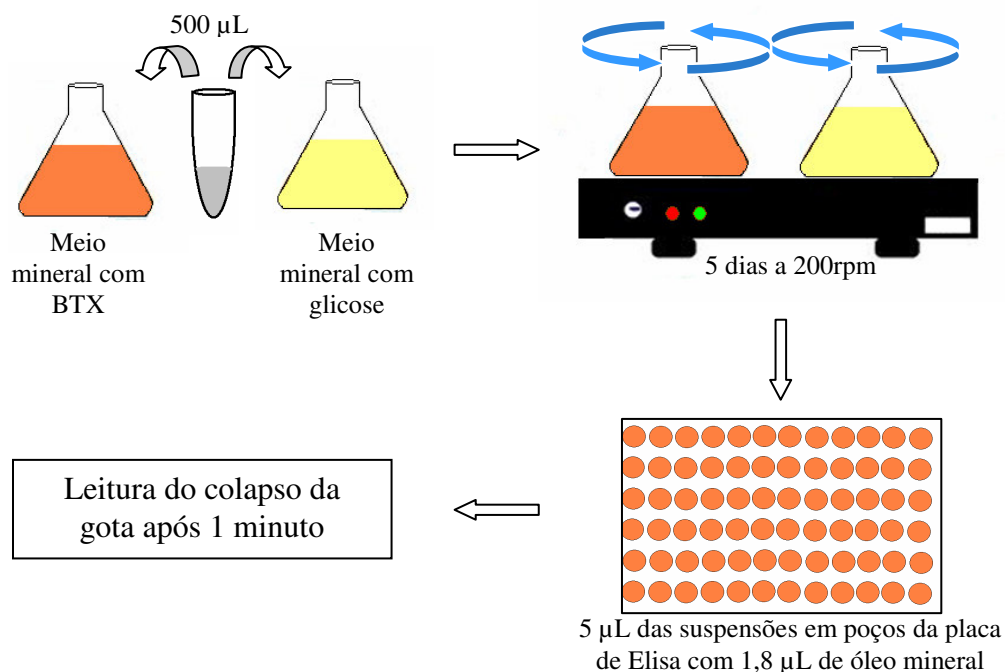


Figura 15: Esquema do experimento de colapso da gota.

3.8- Screening em BTX (Benzeno, tolueno e xileno) – Foram transferidos 10 μL dos inóculos para placas de Petri contendo meio mínimo mineral com BTX (30 mM) em triplicata. O controle negativo foi feito utilizando placas de Petri contendo meio mínimo mineral sem fonte de carbono e, para o controle positivo, utilizou-se meio mínimo mineral com 1% de glicose (Figura 16). Foram considerados positivos para crescimento em BTX os microrganismos que não cresceram no controle negativo, e apresentaram crescimento nas placas com BTX.

Os microrganismos que utilizaram BTX foram submetidos ao teste para verificar a via de clivagem do catecol e à extração de DNA e amplificação por PCR.

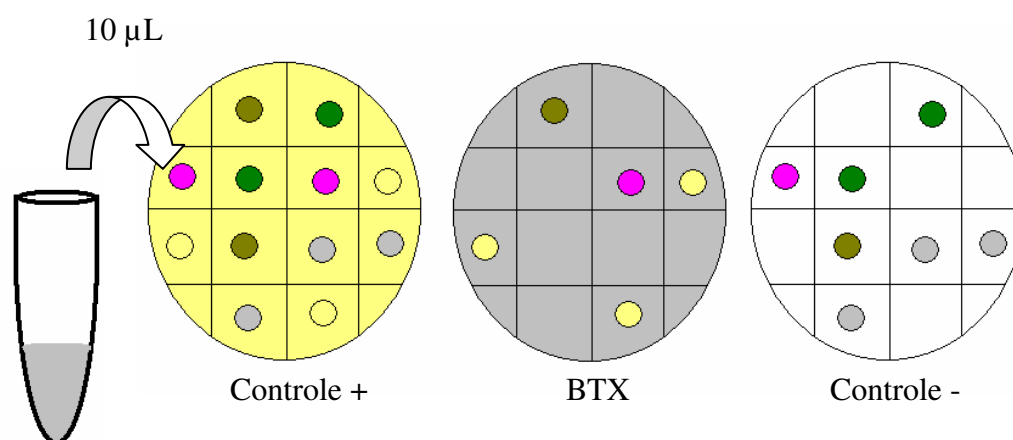


Figura 16: Esquema do *screening* em BTX.

3.8.1- Determinação da via de clivagem do catecol- Para a determinação da via de clivagem do catecol, 1 mL dos inóculos bacterianos capazes de mineralizar BTX como fonte de carbono foram colocados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 10 mL de meio mínimo mineral acrescidos de 5 μL de benzeno. Os frascos foram incubados sob agitação a 120 rpm por 24 h à temperatura ambiente. As

células foram sedimentadas por centrifugação, lavadas três vezes com tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8,0). A seguir, as células obtidas foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 1,5 mL de tampão Tris-HCl (0,50 mM pH 8,0), 0,3 mL de tolueno e 1,5 mL de catecol a 9 mM, os quais foram agitados vigorosamente e incubados a 28°C. No caso de meta clivagem do substrato, uma cor amarela seria formada dentro de 15 a 60 minutos devido ao acúmulo de semialdeído 2-hidroxiacético. Quando a cor amarela não foi observada, os tubos foram incubados por 12 horas e então testados quanto a presença de β -cetoacido pela reação de Rothera (STANIER et al., 1996), que consiste na adição de 1 g de uma mistura seca, constituída de 60 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,6 g de nitroprussiato de sódio e 0,5 mL de solução de amônia (33%), aos tubos de ensaio. A formação da coloração roxa indica a quebra do catecol pela via de orto clivagem (HAMMANN & KUTZNER, 1998).

Todas as análises que envolveram a utilização direta do benzeno foram feitas em capela química de exaustão classe 100 e com o uso de luvas e máscaras de proteção contra gases, para proteção do manipulador.

3.8.2- Padronização dos protocolos de extração de DNA e PCR para os microrganismos utilizadores de BTX

3.8.2.1 – Extração de DNA - Os microrganismos que foram capazes de crescer utilizando BTX foram estriados em placas contendo meio mineral e BTX (30 mM). A seguir, foi retirada uma colônia de cada isolado e colocadas em tubos

com 10 mL de meio TSB por 24 h à temperatura ambiente sob agitação (120 rpm). As células foram precipitadas por centrifugação por 2 min a 6.000 rpm, e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado em 800 µL de água destilada estéril, centrifugou-se por 2 min a 6.000 rpm, e o sobrenadante foi descartado, depois este procedimento foi repetido com 500 µL de água destilada estéril. As células foram ressuspendidas em 200 µL de tampão TE 50/50, pH 8,1. Para a lise das células, foi procedido o choque térmico, colocando-as em água fervente por 5 min, e mergulhando em nitrogênio líquido por 10 seg, repetindo-se o choque três vezes. Foram adicionados 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 e centrifugou-se a mistura por 10 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo, medindo-se o seu volume. Adicionou-se 70% de isopropanol e 10% de acetato de sódio (3M) à solução, deixando-a descansar por 10 min. Centrifugou-se a 10.000 rpm/10 min e o sobrenadante foi descartado. O tubo foi lavado com etanol a 70% gelado. Deixou-se secar, e ressuspendeu-se o DNA em 20 µL de água mili-Q. Para a visualização das bandas, foi feita uma eletroforese em gel de agarose.

3.8.2.2 - Amplificação por PCR - Utilizou-se os primers para amplificação de rDNA 16S de bactérias, F984 (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3') e R1378 (5'CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3'), com o seguinte programa: 94º C por 5 minutos para a desnaturação do DNA; 35 ciclos de 94º C por 1 min, 60º C por 2 min para o anelamento dos primers, e 72ºC por 2 min; e uma extensão final de 72º

C por 1 min. Os produtos do PCR foram, então, submetidos a uma eletroforese em gel de agarose, para a visualização dos produtos obtidos.

3.8.2.3 - Purificação dos fragmentos amplificados – Os produtos do PCR foram purificados utilizando-se o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA), de acordo com as especificações do fabricante, a seguir, foi feita a eletroforese em gel de agarose para a visualização das bandas.

3.8.2.4 - PCR em placa pré-sequenciamento – Utilizou-se o DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems (Amersham Biosciences), utilizando uma reação com o volume de 5 μ L por amostra. Assim, foram colocados 2 μ L do premix, 0,5 μ L do primer F984 (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3'), 1 μ L de água destilada estéril e 1,5 μ L de DNA. As amostras foram colocadas no termociclador, utilizando-se a seguinte programação repetida em 40 ciclos: 95 $^{\circ}$ C por 10 seg., 50 $^{\circ}$ C por 15 seg. e 60 $^{\circ}$ C por 1 min. e 20 seg.

3.8.2.5 - Precipitação do DNA - Adicionou-se a cada amostra 1 μ L de acetato de amônio a 7,5 M, colocou-se na centrífuga rapidamente a 1.700 rpm. A seguir, colocou-se 25 μ L de álcool etílico absoluto e agitou-se no Vortex vigorosamente, deixou-se descansar por 15 min. e centrifugou-se por 45 min a 4.000 rpm a 4 $^{\circ}$ C, descartando o sobrenadante. Adicionou-se 150 μ L de etanol a 70% e centrifugou-

se por 15 a 20 min. a 4.000 rpm a 4° C, descartando a seguir o sobrenadante. Centrifugou-se a placa invertida rapidamente a 1.700 rpm., adicionou-se então 5 µL de formamida e agitou-se por 30 min. no Vortex. Em seguida, colocou-se as amostras para sequenciamento no aparelho Mega Bace 1000 – DNA Analysis System – Amersham Life Science, para uma corrida de 2 h, no laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Contagem de microrganismos em placas com meio para heterotróficos totais (HT) - Os resultados demonstram que o crescimento dos microrganismos heterotróficos totais do sedimento sem adição de petróleo atingiu 10^8 UFC. mL⁻¹ (Figura 17). Estes valores foram maiores do que os resultados obtidos por RAMSAY et al. (2000), que atingiram uma contagem de 10^4 a 10^5 UFC. mL⁻¹ de sedimento de manguezal não contaminado.

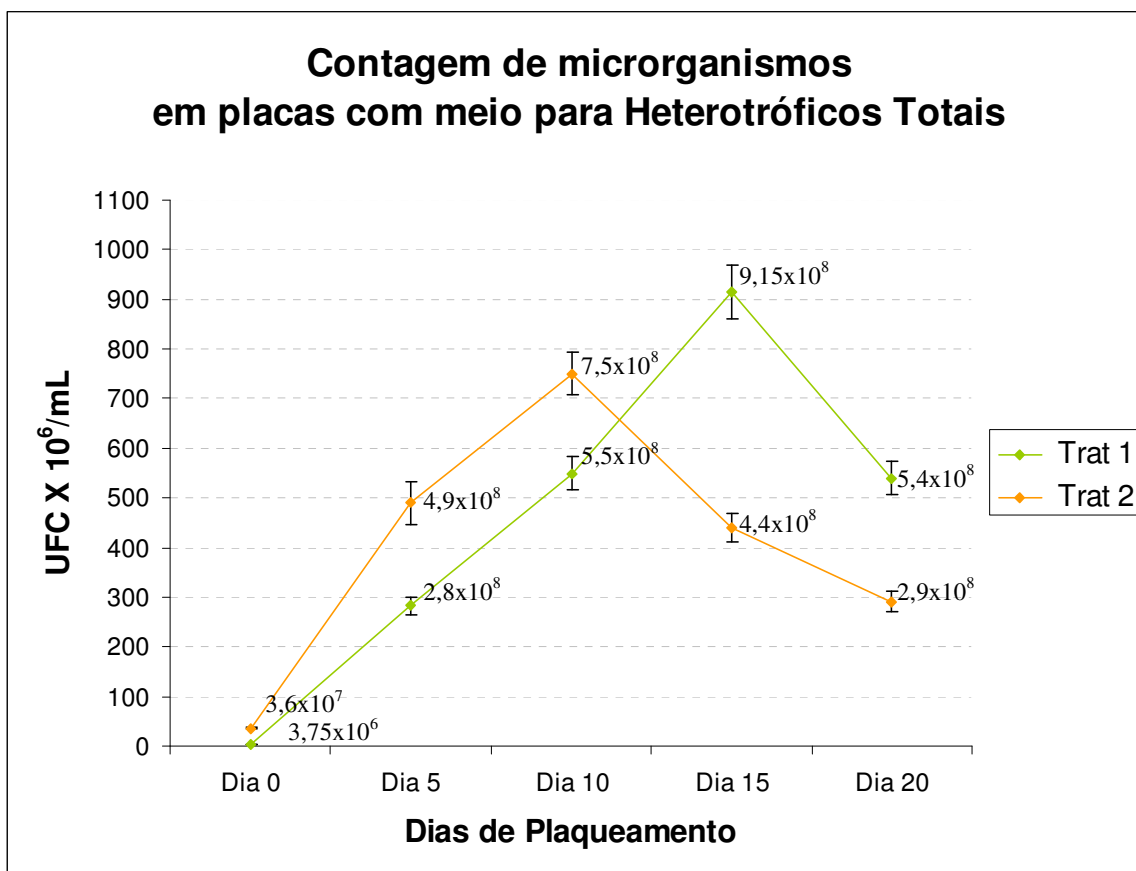


Figura 17: Médias das 8 diluições efetuadas em duplicata para contagem de microrganismos de sedimento não contaminado (Trat 1) e contaminado (Trat 2) com petróleo em placas com meio de heterotróficos totais (HT).

Para o sedimento com adição de petróleo, o crescimento microbiano em placas de heterotróficos totais (HT) também atingiu 10^8 UFC.mL⁻¹. RAMSAY et al. (2000), encontraram valores de 10^6 a 10^7 UFC. mL⁻¹, ou seja, um aumento de 100 vezes na contagem de heterotróficos totais. CURY (2002), também observou um aumento na contagem de HT com a presença de petróleo no sedimento de manguezal. No presente trabalho, o aumento de heterotróficos totais não foi observado com a adição de petróleo ao sedimento. O valor encontrado em placas de HT para microrganismos do sedimento após a incubação com petróleo (10^8 UFC. mL⁻¹) foram inferiores aos obtidos por MACIEL (2004), para os heterotróficos totais de solo de *landfarm* 10^{11} UFC. mL⁻¹. Este alto valor, porém é atribuído a um ambiente impactado com petróleo durante muito tempo, e com estímulo da microbiota local por adição de nutrientes e aeração, assim, os microrganismos de *landfarm* são selecionados para a degradação de petróleo, explicando o alto número de organismos encontrados.

Embora não tenha sido observada uma mudança no número de microrganismos, é possível que o petróleo tenha provocado uma diminuição na riqueza de espécies. Assim, as espécies observadas após a incubação do sedimento com o petróleo, provavelmente representam a comunidade de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, que aumentou em número para ocupar os nichos disponíveis após a morte dos microrganismos que não foram capazes de utilizar o petróleo. De acordo com SANTOS (2004), a entrada de hidrocarbonetos em um ecossistema pode resultar num aumento seletivo ou decréscimo da comunidade microbiana. Pode ocorrer um aumento das populações de um número restrito de microrganismos selecionados pelas condições do meio (ATLAS, 1995), e diminuição de outras, que não possuam capacidade de utilizar

estes compostos como substrato para o seu crescimento, ou que sejam mais sensíveis à toxicidade destes contaminantes. O efeito do poluente no tamanho da população dependerá da sua composição química e das espécies de microrganismos presentes na comunidade (SANTOS, 2004).

4.2 - Contagem de microrganismos em placas com meio para degradadores de petróleo - Neste trabalho, observou-se um alto crescimento de microrganismos do sedimento normal em placas com petróleo, atingindo 10^7 UFC.mL⁻¹ (Figura 18). Segundo BUGG & WINFIELD (1998), o crescimento de microrganismos em placas com petróleo pode ser explicado pela grande concentração de compostos aromáticos recalcitrantes naturais no sedimento de manguezal, como a celulose e a lignina. Os microrganismos destes ecossistemas sustentam a cadeia alimentar com base na decomposição de troncos e folhas das árvores de mangue, possuindo vias metabólicas para a degradação de substâncias aromáticas naturais, assim, as mesmas enzimas utilizadas para a degradação destes compostos, podem ser utilizadas para a degradação de compostos aromáticos do petróleo (HERNANDEZ-ANTARA & SOLIS-WEISS, 1987; BUGG & WINFIELD, 1998). Em solo de mata atlântica, utilizado por MACIEL (2004), não foi observado crescimento microbiano significativo em meio com petróleo, indicando que os microrganismos deste ambiente apresentaram baixa capacidade de utilizar esta substância como substrato para o seu crescimento.

O crescimento dos microrganismos do sedimento com petróleo em placas de petróleo atingiu 10^7 UFC.mL⁻¹. O valor encontrado foi aproximado ao encontrado por MACIEL (2004) em solo de *landfarm*. Demonstrando, mais uma vez, o potencial dos microrganismos de manguezal para a degradação de compostos do petróleo.

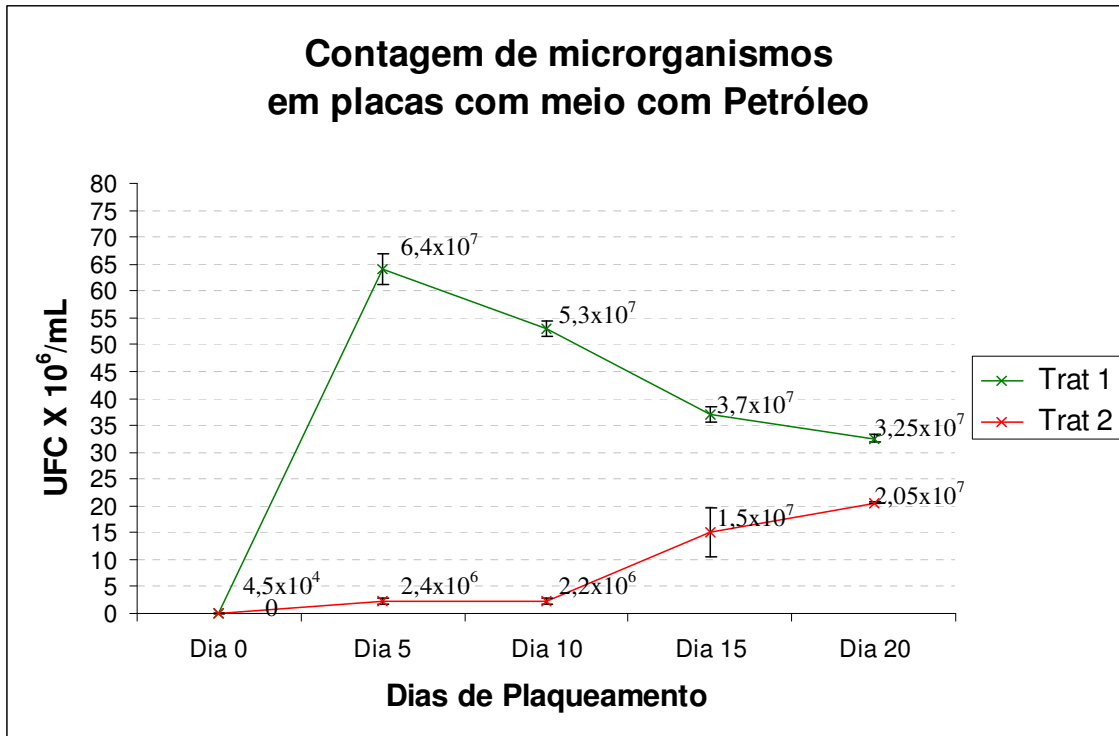


Figura 18: Médias das 8 diluições efetuadas em duplicata para contagem de microrganismos de sedimento não contaminado (Trat 1) e contaminado (Trat 2) com petróleo em placas com meio mineral com petróleo (PET).

Observa-se na Figura 18 que a contagem de microrganismos do sedimento normal aumenta inicialmente, e diminui ao longo dos dias de incubação em tampão fosfato. Este fato pode significar que não há utilização do petróleo da placa pelos microrganismos, mas sim a utilização de reserva energética, proveniente de outras fontes de carbono existentes no sedimento. Levando em consideração que as fontes de carbono facilmente degradáveis devem ter sido consumidas e esgotadas pelos microrganismos durante o tempo de incubação com petróleo, pode-se deduzir que os microrganismos que cresceram em placas de petróleo após a incubação do sedimento com esta substância são efetivamente degradadores de hidrocarbonetos, uma vez que foi observado aumento na contagem microbiana ao longo dos dias, indicando uma seleção na microbiota por este poluente.

Observou-se com os resultados da ANOVA e pelo teste de Tukey (Figura 19), que houve diferença significativa entre as médias de contagem nas placas de heterotróficos totais e as médias de contagem em placas com petróleo para ambos os sedimentos, com $F(1,36) = 41,68$ e $p = 0,000$; demonstrando que o tipo de meio de cultura utilizado influenciou na contagem microbiana. Ou seja, as contagens em placas para heterotróficos totais foram significativamente maiores do que as contagens em placas de petróleo para os dois tipos de tratamentos aplicados ao sedimento (sedimento normal e sedimento com adição de petróleo). Quando são comparadas as contagens de microrganismos em placas de heterotróficos totais no sedimento normal e no sedimento incubado com petróleo, não há diferença significativa, bem como para as contagens em placas com petróleo para ambos os sedimentos, com $F(1,36) = 1,33$ e $p > 0,05$, indicando que a presença do petróleo no sedimento não causa modificação significativa no número de microrganismos presentes no sedimento. Assim, observou-se que o tipo de meio de cultura influencia na contagem de microrganismos, mas a presença ou ausência do petróleo não causa tal mudança.

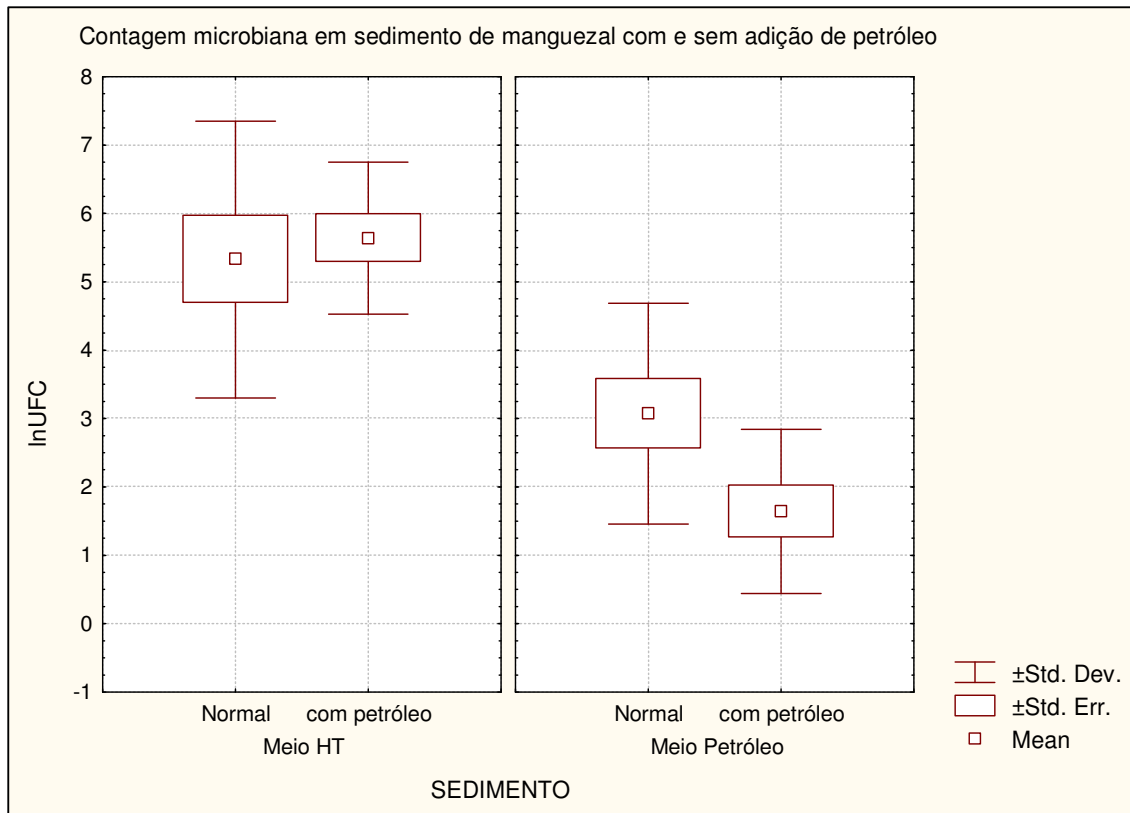


Figura 19: ANOVA “two way” e teste de Tukey da contagem de microrganismos de sedimento de manguezal sem adição de petróleo (normal) e com adição de petróleo em placas com meio para heterotróficos totais e com meio para degradadores de petróleo.

4.3 – Análise da evolução de CO₂ no sedimento - A produção de CO₂ no sedimento foi avaliada em frasco biométrico de Bartha. Para o sedimento com petróleo, foi observada uma fase lag entre os dias três e seis, demonstrando a necessidade de adaptação da microbiota ao petróleo adicionado ao sedimento. Observou-se também que a produção de CO₂ no sedimento se manteve mais alta com a adição de petróleo após o 6º dia de incubação, mostrando que uma fonte extra de carbono estava sendo utilizada pelos microrganismos, assim, o petróleo mostrou-se responsável pelo aumento na produção de CO₂. A leitura do dia 9 mostra que houve um aumento na produção de CO₂, indicando adaptação às novas fontes de carbono. No sedimento sem adição de petróleo, a matéria orgânica é prontamente mineralizada, e com o passar do tempo, a produção de CO₂ decai em

função do consumo e esgotamento das fontes de carbono pelos microrganismos do sedimento (Figura 20). Comparando as duas amostras, é evidente a ação do petróleo sobre atividade microbiana no sedimento. Particularmente estes estudos de biodegradabilidade fazem menção ao uso de procedimento normatizado pela Environmental Protection Agency (EPA 560/6 - 82 - 003), o que permite determinar a biodegradabilidade de uma substância em relação à quantidade de CO₂ derivado de mineralização. Os controles feitos com emissões de CO₂ não garantem resultados universais e cada resultado deve ser analisado de acordo com o tipo de amostra usado no experimento.

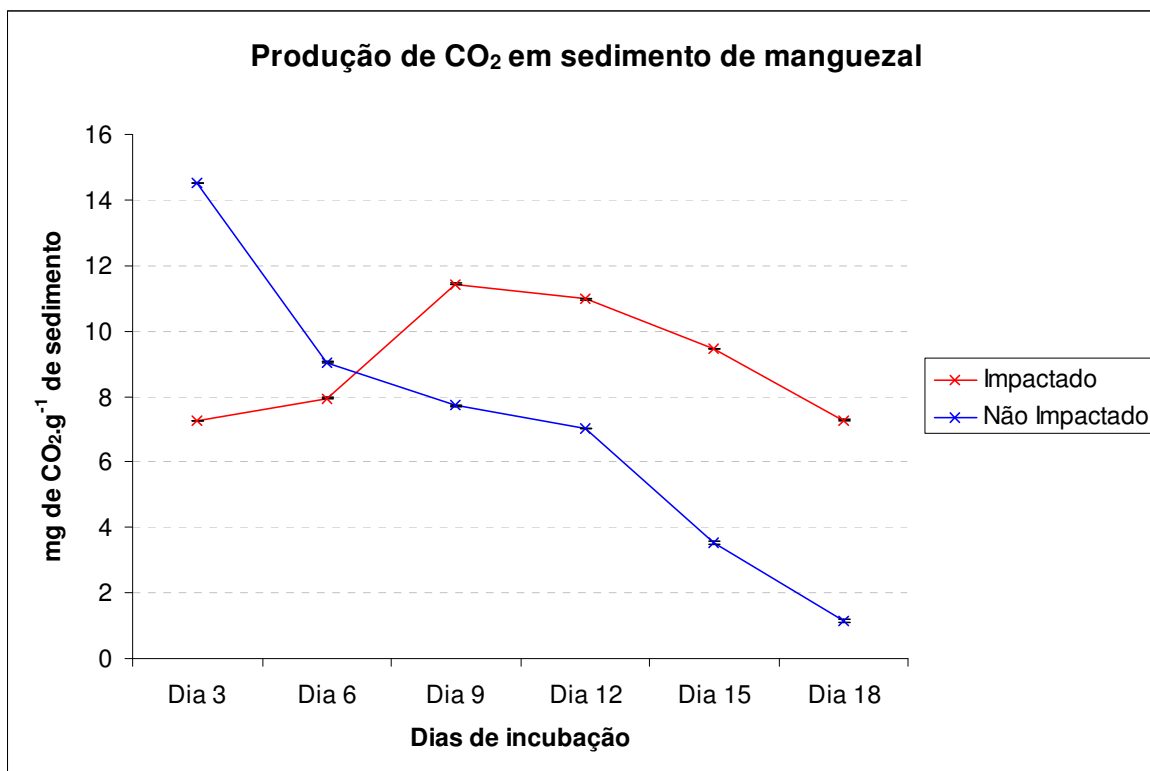


Figura 20: Média de duas repetições da evolução da produção de CO₂ em sedimento de manguezal impactado e não impactado com petróleo.

4.4 – Teste de colapso da gota para detecção da produção de biossurfactantes - Os isolados dos tratamentos 1 e 2 que cresceram nas placas de petróleo foram submetidos ao teste de colapso da gota para verificar sua capacidade de produção de biossurfactantes. Não foi detectada nenhuma bactéria isolada capaz de produzir biossurfactante por este teste, embora alguns dos isolados tenham sido capazes de crescer em BTX. Esta situação é atípica, pois é comum encontrar microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos que também produzam biossurfactantes.

MACIEL (2004) isolou 60 linhagens microbianas de solo de *landfarm* todas com capacidade de degradar compostos de petróleo, destes, 11 isolados demonstraram capacidade de produzir biossurfactantes pelo teste de colapso da gota. Uma das possíveis explicações para não serem detectados microrganismos produtores de biossurfactantes pode ser o fato de estes estarem adaptados à degradação de compostos aromáticos como a lignina e a celulose (BUGG & WINFIELD, 1998). Algumas técnicas descritas por TIBURTIUS et al. (2004), CORSEUIL et al. (1998), CORSEUIL & MARINS (1997) e CORSEUIL & ALVAREZ (1996) demonstram a capacidade de alguns microrganismos de utilizar compostos aromáticos sem fazer menção à produção de biossurfactantes. Portanto, estes microrganismos podem possuir uma via metabólica para a degradação de compostos aromáticos, consumindo o petróleo sem a necessidade da produção dos biossurfactantes (BUGG & WINFIELD, 1998). YOUSSEF et al. (2004) comparou vários testes para verificar a produção de biossurfactantes por microrganismos, considerando o teste de colapso da gota, um método rápido e confiável para a detecção destas substâncias, porém, a mensuração da tensão superficial com o uso do tensiômetro, é mais precisa do que o teste utilizado no presente estudo. Diante

disso, admite-se que o teste de colapso da gota pode ter apresentado um ou mais resultados falso-negativos.

4.5 - Screening em BTX (Benzeno, tolueno e xileno) –. Os microrganismos isolados de placas com petróleo foram incubados em meio mineral líquido contendo BTX. Para os 234 isolados a partir do sedimento sem adição de petróleo, observou-se que 55 cresceram no meio líquido com BTX. Enquanto para os 156 isolados a partir do sedimento incubado com petróleo 19 foram capazes de utilizar BTX. Os microrganismos selecionados foram submetidos ao plaqueamento em meio com BTX, e em placas de controle negativo e positivo. Dos 55 isolados selecionados a partir do sedimento sem petróleo, três cresceram em placas com BTX, e dos 19 isolados selecionados a partir do sedimento com petróleo, sete cresceram em BTX. Observa-se assim, que a incubação do sedimento com petróleo provocou um aumento no número de microrganismos capazes de utilizar BTX como fonte de carbono, portanto, é evidente a ação seletiva destes compostos sobre os microrganismos isolados. Aqueles que cresceram nas placas de BTX e não apresentaram crescimento no controle negativo foram selecionados para o teste para a determinação da via de clivagem do catecol. Os resultados deste *screening* estão apresentados nas Tabelas 2 e 3 (os isolados que não estão apresentados na tabela não apresentaram crescimento em meio mineral líquido com BTX).

Tabela 2: Screening em BTX das bactérias isoladas a partir do sedimento de manguezal sem adição de petróleo.

Nº do isolado	BTX líquido	Placa de BTX	Controle negativo	Controle positivo
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
6	+	-	+	+
15	+	-	+	+

Cont. Tabela 2

Nº do isolado	BTX líquido	Placa de BTX	Controle negativo	Controle positivo
23	+	-	+	+
25	+	-	+	+
26	+	-	+	+
28	+	-	+	+
30	+	-	+	+
35	+	-	+	+
36	+	-	+	+
46	+	-	+	+
50	+	-	+	+
53	+	-	+	+
54	+	-	+	+
57	+	-	+	+
71	+	-	+	+
76	+	-	+	+
*80	+	+	-	+
81	+	-	+	+
83	+	-	+	+
84	+	-	+	+
*85	+	+	-	+
86	+	-	+	+
87	+	-	+	+
89	+	-	+	+
*93	+	+	-	+
94	+	-	+	+
98	+	-	+	+
110	+	-	+	+
111	+	-	+	+
112	+	-	+	+
113	+	-	+	+
114	+	-	+	+
115	+	-	+	+
116	+	-	+	+
117	+	-	+	+
118	+	-	+	+
119	+	-	+	+
120	+	-	+	+
121	+	-	+	+
122	+	-	+	+
123	+	-	+	+
124	+	-	+	+
125	+	-	+	+
126	+	-	+	+
127	+	-	+	+
128	+	-	+	+
129	+	-	+	+
132	+	-	+	+
133	+	-	+	+
134	+	-	+	+
137	+	-	+	+
141	+	-	+	+
284	+	-	+	+

* = Isolados com crescimento positivo em BTX.

Tabela 3: Screening em BTX das bactérias isoladas a partir do sedimento de manguezal com adição de petróleo.

Nº do isolado	BTX líquido	Placa de BTX	Controle negativo	Controle positivo
*2	+	+	-	+
*3 A	+	+	-	+
*3 B	+	+	-	+
4	+	-	+	+
27	+	-	+	+
35	+	-	+	+
49	+	-	+	+
51	+	-	+	+
121	+	-	+	+
*128 A	+	+	-	+
*128 B	+	+	-	+
143	+	-	+	+
150	+	-	+	+
151	+	-	+	+
152	+	-	+	+
*154 A	+	+	-	+
*154 B	+	+	-	+
155	+	-	+	+
156	+	-	+	+

*= Isolados com crescimento positivo em BTX.

De acordo com as Tabelas 2 e 3, foram selecionados os isolados 80, 85 e 93 do sedimento sem adição de petróleo, e os isolados 2, 3A, 3B, 128A, 128B e 154A e 154B do sedimento incubado com petróleo, que demonstraram utilizar o BTX como única fonte de carbono, crescendo neste meio, provavelmente sem utilizar reservas energéticas, uma vez que não cresceram no controle negativo.

Estas bactérias são de grande interesse biotecnológico, uma vez que os BTXs são compostos presentes em concentrações consideráveis na gasolina, e são comuns os casos de vazamento em tanques subterrâneos de combustíveis em postos de abastecimento. Alguns autores demonstraram a ampla distribuição de bactérias degradadoras de BTX na natureza, as quais podem ser úteis na biorremediação *in situ* de derramamentos de compostos com estas substâncias (TIBURTIUS et al., 2004; CORSEUIL et al., 1998; CORSEUIL & MARINS, 1997; CORSEUIL & ALVAREZ, 1996). As bactérias capazes de degradar BTX foram submetidas ao teste para verificar a via de degradação do catecol, à extração de DNA, amplificação por PCR e identificação por sequenciamento.

4.6 - Determinação da via de clivagem do catecol - No teste para detectar a via de degradação do catecol, observou-se que a maioria das bactérias degradavam o catecol por via orto, e uma utilizou a via meta. Os resultados para este teste estão apresentados nas Tabela 4 e 5.

Tabela 4: Via de degradação do catecol por bactérias isoladas a partir do sedimento de manguezal não contaminado com petróleo.

Nº do Isolado	Via de degradação do catecol
80	orto
85	orto
93	orto

Tabela 5: Via de degradação do catecol por bactérias isoladas a partir do sedimento de manguezal contaminado com petróleo.

Nº do Isolado	Via de degradação do catecol
2	orto
3A	orto
3B	orto
128A	meta
128B	orto
154A	orto
154B	orto

A Figura 21 demonstra a transformação do benzeno em catecol, o qual é quebrado pelas dioxigenases, seguindo uma das duas vias, de acordo com o local da quebra do anel.

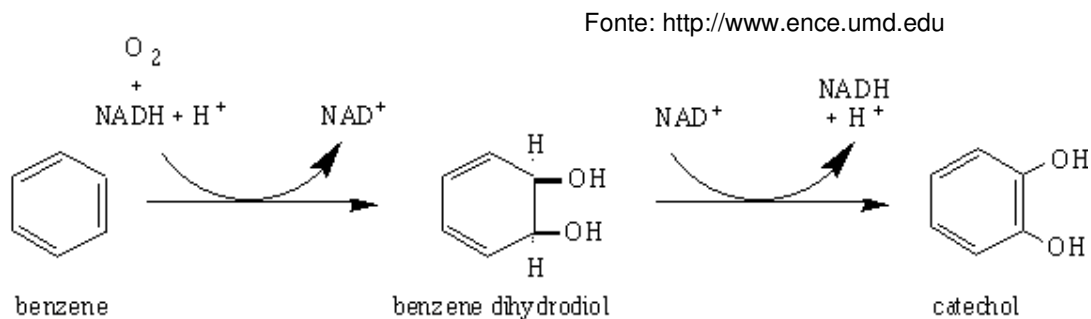


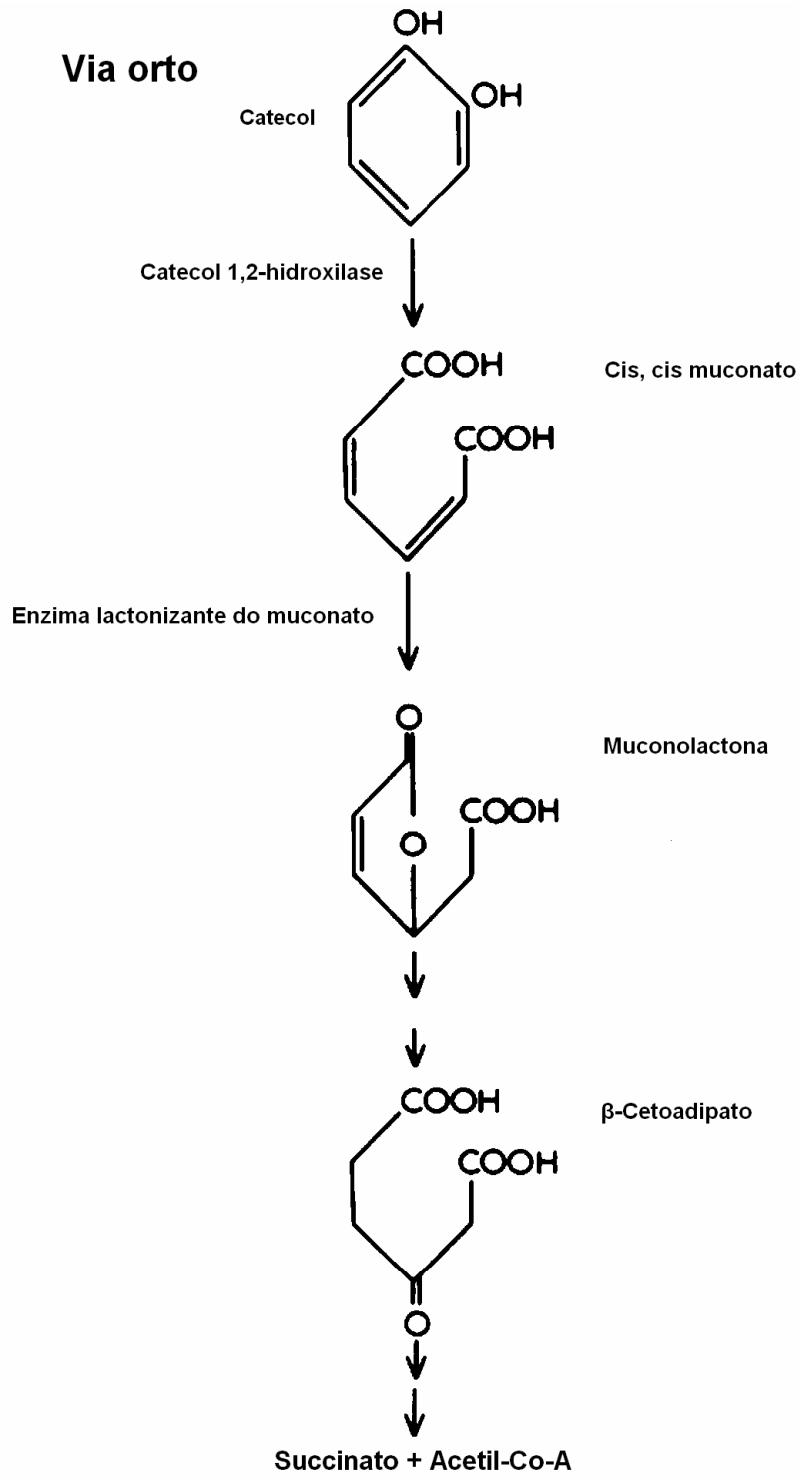
Figura 21: Transformação do benzeno em catecol

Nove isolados (2, 3A, 3B, 80, 85, 93, 128B, 154A e 154B) fizeram a clivagem do catecol pela via orto, que se caracteriza pela coloração roxa após a reação de Rothera, a qual indica a presença de β -cetoadipato (Figura 22).



Figura 22: Orto clivagem do catecol.

Na via orto, os hidrocarbonetos aromáticos são oxidados pelas dioxigenases a *cis,cis*-dihidrodiol, e este é convertido para catecol. O anel aromático dihidroxilado é, então, aberto por uma orto-clivagem oxidativa através da enzima catecol 1,2-hidroxilase, resultando em ácido *cis, cis*-mucônico (SMITH, 1990). Este, é metabolizado por meio da enzima lactonizante do muconato a muconolactona, e esta, oxidativamente a ácido β -cetoadipato, o qual é aberto oxidativamente para o ciclo tricarboxílico intermediário comum, a ácido succínico, e Acetil-CoA (Figura 23).



Fonte: MURRAY & WILLIAMS, 1974 (modificado)

Figura 23: Via orto de degradação do catecol a succinato + acetil-Co-A.

Alternativamente, pode ser utilizada a via meta. Apenas o isolado 128A fez a clivagem do catecol por esta via, que é caracterizada pela coloração amarela devido ao acúmulo de semialdeído 2-hidroxiacético (Figura 24).

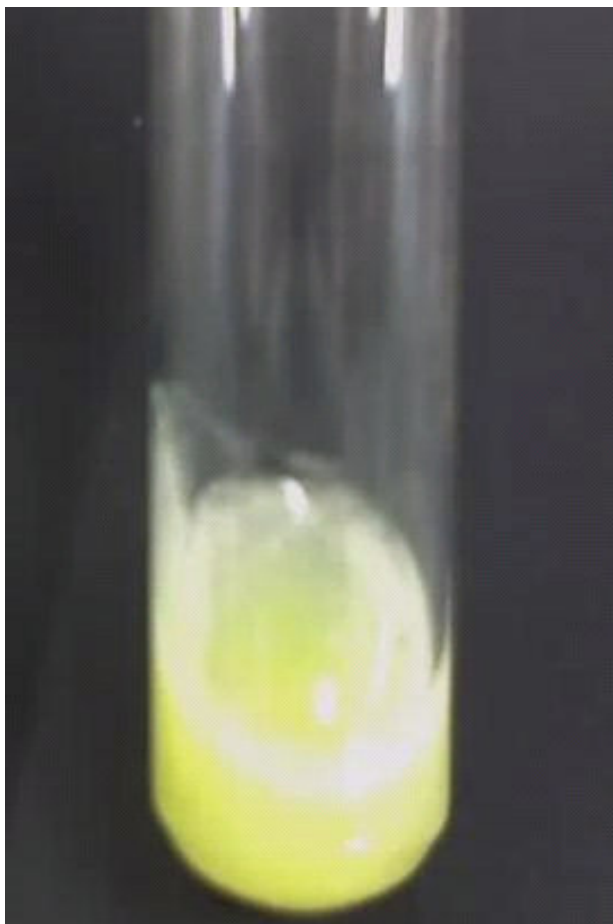


Figura 24: Meta clivagem do catecol.

Na meta clivagem o catecol é aberto através da enzima catecol 2,3-hidroxilase, transformando-se em semialdeído 2-hidroxiacético. Pela enzima semialdeído 2-hidroxiacético hidrolase este pode ser convertido a 2-oxo-4-pentanoato. Ou pela semialdeído 2-hidroxiacético desidrogenase a 4-oxalocrotonato (enol), o qual é modificado a oxalocrotonato (cetona) pela

oxalocrotonato tautomerase. Este composto é transformado pela enzima oxalocrotonato descarboxilase em 2-oxo-4-pentanoato. A enzima 2-oxo-4-pentenoato hidratase converte o 2-oxo-4-pentanoato em 4-hidroxi-2-oxovalerato, a qual chega a piruvato e acetaldeído pela ação de enzima 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolase (Figura 25).

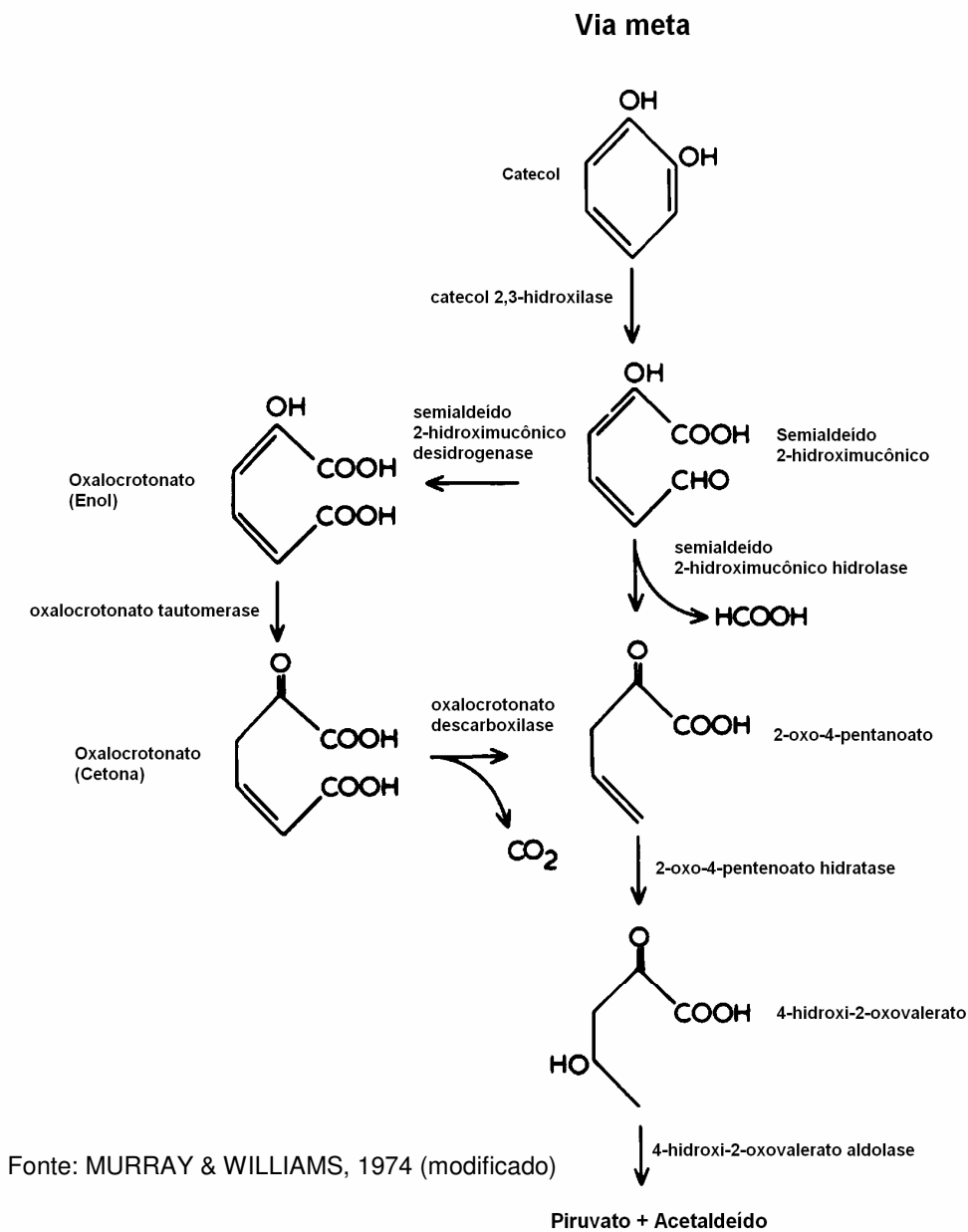


Figura 25: Via meta de degradação do catecol a piruvato + acetaldeído.

Os resultados encontrados demonstram que o número de bactérias capazes de crescer em BTX é maior após o impacto com petróleo no sedimento. Assim, observa-se que a presença do petróleo causou uma seleção das bactérias capazes de degradar compostos aromáticos no sedimento.

PAUL et al. (2004) descreveram a utilização da via orto por duas linhagens de bactérias *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 e *Burkholderia cepacia* RKJ200 na degradação de um pesticida. ARENGHI et al. (2001) registrou o mecanismo de regulação da meta clivagem por *Pseudomonas stutzeri* OX1. KUKOR & OLSEN (1991) também descreveram a regulação da meta clivagem do catecol por *Pseudomonas pickettii* PKO1. Em contrapartida, MURRAY & WILLIAMS (1974) registraram que *Pseudomonas putida* NCIB 10015 metaboliza fenóis e cresóis pela via meta, e o benzoato pela via orto, e dependendo do seu substrato de crescimento, a via meta ou orto é estimulada nesta linhagem bacteriana. Assim, observa-se que uma mesma linhagem bacteriana é capaz de realizar as duas vias metabólicas, dependendo do substrato disponível para o seu crescimento.

O destino dos hidrocarbonetos, além da produção de CO₂ na degradação total, pode também oferecer caminhos alternativos. Eles podem ser armazenados, transformados em biomassa (BERTRAND et al., 1983; DUMENIL et al. 1988), ou convertidos em outros subprodutos. Em longo prazo, a maioria dos hidrocarbonetos é convertida a CO₂; entretanto, os produtos parcialmente oxidados podem ser mais tóxicos e mutagênicos que o hidrocarboneto e, portanto, existe a preocupação de que ocorra um aumento temporário na toxicidade e mutagenicidade durante o processo de biodegradação (WANG et al., 1990).

Uma toxicidade residual pode ocorrer devido à presença de intermediários tóxicos ou produtos finais. Por exemplo, o catecol é um intermediário comum a

numerosas vias de degradação de compostos aromáticos (GIBSON & SUBRAMANIAN, 1984), e foi constatado que este composto é uma substância significativamente mais tóxica que o benzeno. Assim, a presença desses tipos de resíduos tóxicos pode levar à morte das células (SANTOS, 2004).

4.7 - Extração de DNA, PCR e purificação – Foi efetuada a extração de DNA dos isolados capazes de utilizar BTX como única fonte de carbono, e as bandas foram visualizadas em gel de agarose (Figura 26).

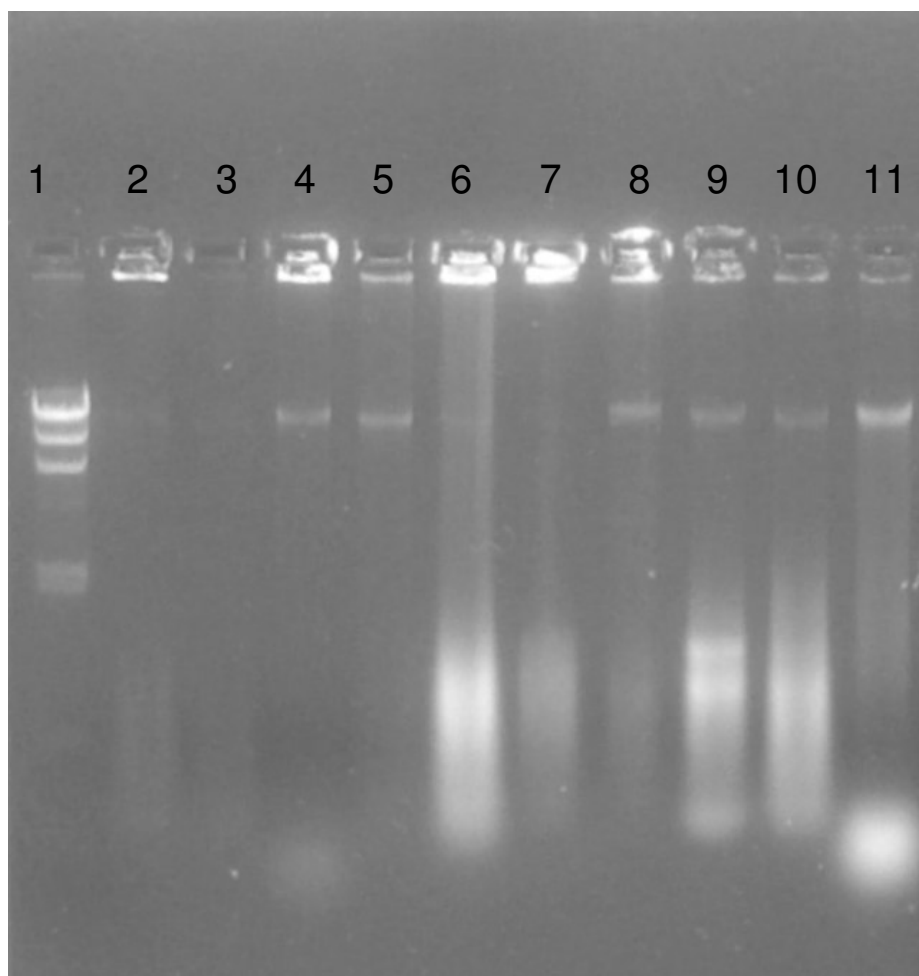


Figura 26: Gel de agarose mostrando as bandas do DNA extraído das bactérias isoladas. Na primeira canaleta foi aplicado o marcador, na segunda o isolado 2, na terceira o 3A, na quarta o 3B, na quinta o 128A, na sexta o 128B, na sétima o 154A, na oitava o 154B, na nona o 80, na décima o 85 e na décima primeira o 93.

Pela fotografia do gel, com bandas bem visíveis para a maioria dos isolados, pôde-se observar que a extração do DNA bacteriano foi efetuada com sucesso, embora os isolados 2, 3A, 128B e 154A tenham apresentado bandas pouco visíveis no gel, demonstrando uma pequena quantidade de DNA. Isto pode ter ocorrido devido à presença de uma menor quantidade de células destes microrganismos no meio de cultura no momento da extração ou de uma parede celular mais rígida (bactérias Gram-positivas), dificultando a sua ruptura no momento do choque térmico. Os DNAs extraídos apresentaram um tamanho de aproximadamente 20.000 pares de bases (pb) de acordo com o marcador Lamda DNA/Hind III Markers – Promega.

Os DNAs extraídos foram submetidos à amplificação por PCR e purificação dos fragmentos. Para a visualização das bandas, foi efetuada uma eletroforese em gel de agarose (Figura 27).

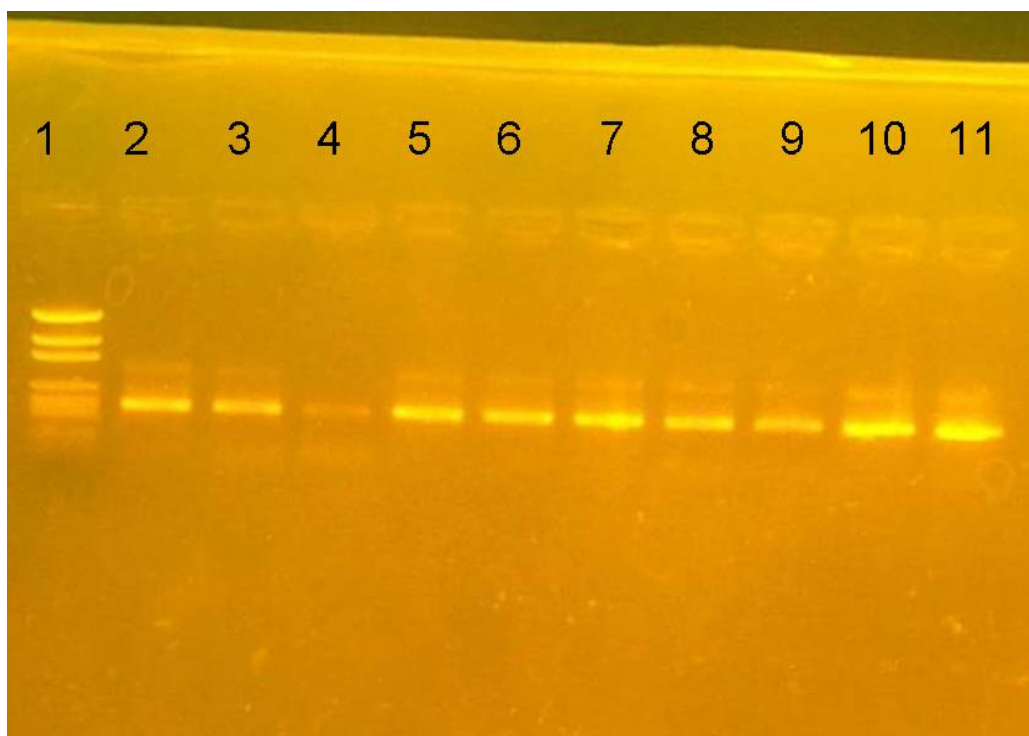


Figura 27: Gel de agarose mostrando as bandas do DNA amplificado e purificado das bactérias isoladas. Na primeira canaleta foi aplicado o marcador, na segunda o isolado 2, na terceira o 3A, na quarta o 3B, na quinta o 80, na sexta o 85, na sétima o 93, na oitava o 128A, na nona o 128B, na décima o 154A e na décima primeira o 154B.

Foi possível visualizar bandas de todos os isolados, demonstrando que o PCR e a purificação foram efetuados com sucesso, observou-se que os produtos do PCR amplificados com os primers F984 (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3') e R1378 (5'CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') apresentaram 517 pares de bases (pb), de acordo com o marcador pGEM[®] DNA Markers - Promega. Esta etapa é essencial para o sequenciamento e posterior identificação molecular destes isolados de grande potencial biotecnológico.

5 - CONCLUSÕES

- O petróleo atua como selecionador sobre a microbiota, como pôde ser visto nos experimentos de contagem microbiana, clivagem do catecol e *screening* em BTX.

- O BTX age como um potente selecionador de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, mesmo entre os microrganismos capazes de crescer em placas com petróleo.

- Os experimentos de clivagem do catecol são de grande importância para a seleção de microrganismos que participam da mineralização de matéria orgânica derivada de petróleo. Neste trabalho, a maioria das bactérias selecionadas fazia a quebra do catecol pela via orto, e uma pela via meta.

- O sedimento do manguezal estudado tem uma grande quantidade de microrganismos com potencial degradativo, uma vez que estes são adaptados à degradação de compostos recalcitrantes, como a celulose e a lignina.

- Este trabalho representa um estudo inicial, gerando dados que permitam a sua continuidade e aprofundamento, além de possibilitar a formação de recursos humanos nesta área de pesquisa. Além disso, o presente estudo possibilitou a seleção de microrganismos com potencial biotecnológico para a degradação de hidrocarbonetos do petróleo.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. **Introduction to Soil Microbiology**. John Wiley & Sons, New York. 1977, 467 p.

ALONGI, D. M. The role of bacteria in nutrient recycling in tropical mangrove and other coastal benthic ecosystems. **Hydrobiologia**, Springer Netherlands, v. 285, nº 1-3, pp. 19 – 32, 1994

ALONGI, D. M.; CHRISTOFFERSEN, P.; TIRENDI, F. The influence of forest type on microbial-nutrient relationships in tropical mangrove sediments. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 171, nº 2, pp. 201-223. 1993.

ALONGI, D. M. Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. **Microbial ecology**. New York NY, v. 15, nº 1, pp. 59-79. 1988.

ARENGHI, F. L. G.; BERLANDA, D.; GALLI, E.; SELLO, G.; BARBIERI, P. Organization and Regulation of *meta* Cleavage Pathway Genes for Toluene and *o*-Xylene Derivative Degradation in *Pseudomonas stutzeri* OX1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, nº 7, p. 3304–3308, 2001.

ATLAS, R. M. Biorremediation of Petroleum Pollutants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, pp. 317-327. Lousville: University of Louisville, 1995.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R.,. Microbial Ecology: Fundamentals and Applications. 3thr. Ed. **Benjamim/Cummings Publ. Co. Inc.**, CA, USA,1992.

ATLAS, R.M. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective. **Microbiological Review**, 45: 180–209, 1981.

BANO, N.; NISA, M-U.; KHAN, N.; SALEEM, M.; HARRISON, P. J.; AHMED, S. I.; AZAM, F. Significance of bacteria in the flux of organic matter in the tidal creeks of the mangrove ecosystem of the Indus River delta, Pakistan. **Marine Ecology Progress Series**, v. 157, pp. 1-12, 1997.

BERTRAND, J.C.; RAMBELOARSOA, J.F.; RONTANI, G.; GIUSTI, G.; MATTEI, G. Microbial Degradation of Crude Oil in Sea Water in Continuous Culture. **Biotechnology Letters**, v. 5, pp. 567 – 572, 1983.

BODOUR, A. A.; & MILLER-MAIER, R. M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **J. Microbiol. Methods**, v. 32, pp. 273 – 280, 1998.

BOTO, K. G.; ALONGI, D. M.; NOTT, A. L. J. Dissolved Organic Carbon-Bacteria Interactions at Sediment-Water Interface in a Tropical Mangrove System. **Marine Ecology Progress Series MESED**, v. 51, nº 3, pp. 243-251, 1989.

BRADDOCK, J. F.; LINDSTROM, J. E.; YEAGER, T. R.; RASLEY, B. T.; BROWN, E. G. Patterns of microbial activity and oiled sediments in Prince William Sound. In: EXXON VALDEZ. **Proceedings of the Exxon Valdez oil spill symposium**. Bethesda: American Fisheries Society. V. 18, p. 94-108, 1996.

BUGG, T. D. H. & WINFIELD, C. J. Enzymatic cleavage of aromatic rings: mechanistic aspects of the catechol dioxygenases and later enzymes of bacterial oxidative cleavage pathways. **Natural Product Reports**, 1998.

BURNS, K., A.; CODI, S.; DUKE, N. C. Gladstone, Australia field studies: weathering and degradation of hydrocarbons in oiled mangrove and salt marsh sediments with and without the application of an experimental bioremediation protocol. **Marine Pollution Bulletin**, v. 41, n. 7-12, p. 392-402, 2000.

CHOSSON, P.; LANAU, C.; CONNAN, J.; DESSORT, D. Biodegradation of refractory hydrocarbon biomarkers from petroleum under laboratory conditions. **Nature**, London, v.351, pp. 640 – 642, 1991.

CORSEUIL, H. X.; HUNT, C. S.; SANTOS, R. C. F.; ALVAREZ, P. J.J. The Influence of the Gasoline Oxygenate Ethanol on Aerobic and Anaerobic BTX Biodegradation. **Water Research**, Londres - Reino Unido, v.32, n.7, pp.2065-2072, 1998.

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

CORSEUIL, H. X.; ALVAREZ, P. J. J. Natural bioremediation perspective for BTX-contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. **Wat. Sci. Tech.**, v. 34, nº 7-8, pp. 311-318, 1996.

CORSEUIL, H. X.; MONTENEGRO, M. A. P.; MARINS, M. D. M. Biorremediação passiva de águas subterrâneas contaminadas com derramamentos de gasolina. Trabalho Técnico, **11º Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, pp. 1442 – 1447, 1996.

COUTINHO, H. C. L.; OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P.; ROSADO, A. S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. **An. Acad. Bras. Ci.**, v. 71, nº 3, pp. 491-503, 1999.

CRAPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G. S.; PEREIRA, D. C. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência hoje**, v. 30 , nº 179, janeiro/fevereiro de 2002.

CURY, J. C. Atividade microbiana e diversidade metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo. **Dissertação de mestrado**, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP. 95p, 2002

DAGLEY, S. A biochemical approach to some problems of environmental pollution. **Essays Biochem.**, v. 11, p. 81-138,1975.

DESAI, J. D., BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potencial. **Microbiol. Mol. Biol. Ver.**, v. 61 (1), pp. 47-64, 1997.

DINESH, R.; CHAUDHURI, S.G.; GANESHAMURTHY, A.N.; PRAMANIK, S.C. Biochemical properties of soils of undisturbed and disturbed mangrove forests of South Andaman (India). **Wetlands Ecology and Management**, v. 12, pp. 309–320, 2004.

DUMENIL, G.; MATTEI, G.; SERGENT, M.; BERTRAND, J.C.; LAGENT, M.; PHANTAN-LUU, R., Application of a Doehlrt Experimental Design to the Optimization of Microbial Degrading of Crude Oil in Sea Water by Continuous Culture. **Applied. & Environmental Microbiology**, v. 27, pp. 405 – 409, 1988.

DYE, A. H. A method for the quantitative estimation of bacteria from mangrove sediments. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 17, nº 2, pp. 207-212. 1983.

DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE™ DNA Analysis Systems. **Amersham Biosciences**.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY , EPA 560/6 - 82 – 003

FLOODGATE, G. T. Some environmental aspects of marine hydrocarbon bacteriology. **Aquatic Microbial Ecology**. V. 9, p. 3 –11, 1995.

GIBSON, D.T.; SUBRAMANIAN, V., Microbial Degradation of Aromatics Hydrocarbons. In: D.T. GIBSON (ed.). **Microbial Degradation of Organic Compounds**. Plenum Press, New York, pp. 181 – 252, 1984.

GIOVANNONI, S. J.; BRITISCHGI, T. B.; MOYER, C. L.; FIELD, K. G. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. **Nature**, v. 345, pp. 60 – 63, 1990.

GRISHCHENKOV, V. G.; TOWNSEND, R. T.; MCDONALD, T. J.; AUTENRIETH, R. L.; BONNER, J. S. and BORONIN, A. M. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic and aerobic conditions. **Process Biochemistry**, v. 35, 889-896, 1999.

GUIMARÃES, C. P. & SILVA, A. ABC dos Estuários e Manguezais – **Cadernos de Educação Ambiental**. Universidade Federal de Sergipe, Aracaju – SE, 1997.

HAMMANN R.; KUTZNER, H.J. Key enzymes for the degradation of benzoate, m- and p-hydroxybenzoate by some members of the order Actinomycetales. **J. Basic Microbiol.**, 38(3): 207-20, 1998.

HALLIER-SOULIER, S., DUCROCQ, V., MAZURE, N., TRUFFAUT, N. Detection and Quantification of Degradative Genes in Soils Contaminated by Toluene. **FEMS. Microb. Ecology**, 20: 121-123, 1996.

HERNANDEZ-ANTARA, P. & SOLIS-WEISS, V. Estúdio de la macrofauna bentica asociada al mangle rojo (*Rhizophora mangle*), em la Laguna de Terminos Campeche, durante un ciclo anual. **Memorias del IX Congreso Nacional de Zoología**. Villahermosa, Tabasco, Mexico. Tomo I, pp. 83 – 85, 13 – 16 de octubre de 1987.

HIGUCHI, T. In: **Extracellular carbohydrates**, eds. W. TANNER and F. A. LOEWUS, Springer-Verlag, New York, pp. 194–224, 1981.

HOPPER, D.J. Aspects of the Degradation of Aromatics by Microorganisms. In: **Biodegradation: Natural and Synthetic Materials**. BETTS, W.B. (ed). Springer-Verlag Limited. London. p. 69 – 89, 1991.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos**, 2^a ed. 351p., Brasília. 1990.

IRWIN, R.J.. **Environmental Contaminants Encyclopedia**. National Park Service, Fort Collins, CO, USA, 1997

KANALY, R. A.; & HARAYAMA, S. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 182, nº 8, p. 2059–2067, 2000.

KANALY, R. A.; BARTHA, R.; WATANABE, K.; SHIGEAKI, H. Rapid mineralization of benzo[a]pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4205-4211, 2000.

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

Kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System. **PROMEGA**, Madison, WI, USA.

KUKOR, J. J. & OLSEN, R. H. Genetic Organization and Regulation of a meta Cleavage Pathway for Catechols Produced from Catabolism of Toluene, Benzene, Phenol, and Cresols by *Pseudomonas pickettii* PKO1. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n^o15, p. 4587-4594, 1991.

LEE, CHI-YUAN & LIN, CHING-HSING. Bacterial growth and substrate degradation by BTX-oxidizing culture in response to salt stress. **J. Ind . Microbiol. Biotechnol** , v. 33, pp. 37– 44, 2006.

LI, G.; HUANG, W.; LERNER, D. N. & ZHANG, X. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. **Wat . Res.** 34. 3845-3853, 2000.

MACIEL, B. M. Estudos prospectivos de microrganismos de solo de *landfarm* com potenciais aplicações em estratégias de biorremediação de áreas contaminadas por petróleo. **Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular**, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - BA, 2004.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Na uptake on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 58, pp. 428 – 434, 2002.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Quim. Nova**, v. 24, nº 1, pp. 87-93, 2001.

MURRAY, K. & WILLIAMS P. A. Role of Catechol and the Methylcatechols as Inducers of Aromatic Metabolism in *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology**, v. 117, nº 3, p. 1153-1157, 1974.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Quim. Nova**, v. 25, nº 5, pp. 772 – 776, 2002.

OLIVEIRA, O. M. C. Diagnóstico Geoambiental em Zonas de Manguezal da Baía de Camamu – BA. Niterói. **Tese de Doutorado em Geoquímica Ambiental** – Universidade Federal Fluminense, 2000.

OTENIO, M. H.; SILVA, M. T. L.; MARQUES, M. L. O.; ROSEIRO, J. C.; BIDOIA, E. D. Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCMI 852. **Brazilian Journal of Microbiology**. V. 36, pp. 258-261, 2005.

PAUL, D.; CHAUHAN, A.; PANDEY, G.; JAIN, R. K. Degradation of *p*-hydroxybenzoate via protocatechuate in *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 and *Burkholderia cepacia* RKJ200. **Current Science**, v. 87, nº 9, 2004.

RAMSAY, M. A.; SWANNELL, R. P. J.; SHIPTON, W. A.; DUKE, N.C.; HILL, R. T. Effect of biorremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 41, n. 7-12, p. 413-419, 2000.

RICHARDSON, M. L. **Risk Assessment of Chemicals in the Environment**. London. Royal Society of Chemistry. 410-411, 1988.

ROOSE-AMSALEG, C.L.; GARNIER-SILLAM, E.; HARRY, M. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. **Applied Soil Ecology**. V. 18, pp. 47-60, 2001.

SANTOS, A. C. F. Utilização do Tolueno Como Única fonte de Carbono por Microrganismos Isolados de um *Landfarming*. **Monografia de Graduação**, Universidade Estadual de Santa Cruz, BA. 2004.

SCRAMIN, S.; DENTZIEN, A. F. M.; MELO, I. S. Indução da enzima pirocatecase por *Acinetobacter baumannii* envolvida na biodegradação do herbicida Diuron. Pesticidas: **R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, pp. 113 – 118, 2003.

SMITH, M.R. the Biodegradation of aromatics Hydrocarbons by Bacteria. **Biodegradation** 1: 191 – 206, 1990.

SILVA, F. S.; LAUT, V. M. ; LAUT, L. L.M.; FIGUEIREDO JUNIOR, A. G.; BONETTI, C.; VIANA, L. G.; CRAPEZ, M. A. C. Avaliação da qualidade ambiental em sedimentos superficiais do estuário do Itacorubi - Baía Norte (SC), utilizando a relação granulometria e atividade respiratória bacteriana. Disponível em: <http://www.abequa2005.geologia.ufrj.br/nukleo/pdfs/0094_fss_xabequa.pdf>.

Acesso em: 15 jan. 2006.

STANGHELINII, M. E.; MILLER, R. M. Biosurfactants: Their identity and potencial efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. **Plant. Dis.** v. 81 (1), 4-12, 1997.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Quim. Nova**, Vol. 27, No. 3, 441-446, 2004.

TORSVIK, V.; SALTE, K.; SORHEIM, R.; GOKSOYR, J. Comparison of Phenotypic Diversity and DNA Heterogeneity in a Population of Soil Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, pp. 776-781, 1990.

TOSTA, C. D. Biotipagem de leveduras industriais através do sistema *killer*. **Dissertação de mestrado**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP. 2004.

TRINDADE, D.; JOVELEVITHIS, D.; BECKER, M. R.; PRATI, C. Evolução de um paciente com hepatite C exposto a produto hepatotóxico. **Rev. Bras. Med. Trab.**, Belo Horizonte . V. 1 . Nº 2 . pp. 149-152, 2003.

WANG, X.; YU, W.; BARTHA, R., Effect of Bioremediation on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Residues in Soil. **Environmental & Science Technology**, v. 24: pp. 1086 – 1089, 1990.

WYATT, J.M.; PALMER, S.J. Biodegradation of Nitriles and Cyanide. *In*: **Biodegradation: Natural and Synthetic Materials**. BETTS, W.B. (ed). Springer-Verlang London Limited. London. p. 69 – 89, 1991.

YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; KNAPP, R. M.; MCINERNEY, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, nº 3, pp. 339 - 347, 2004.

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

ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.

Centro de estudos de petróleo – UNICAMP. Disponível em: <http://www.cepetro.unicamp.br/petroleo/index_petroleo.html>. Acesso em: 27 mar. 2006.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em: 10 fev. 2006.

Composição do petróleo, Disponível em: <<http://www.cepa.if.usp.br/energia/energia1999/Grupo1A/composicao.html>>. Acesso em: 27 jun. 2006.

Dados gerais da cidade de Una. Disponível em: <<http://www.citybrazil.com.br/ba/una/>>. Acesso em: 06 dez. 2005.

Disciplina de microbiologia. KYAW, C. M. Disponível em: <<http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/intromicro/intromicro.html#ubiquidade>>. Acesso em: 04 mai. 2006

Laboratório de toxicologia ocupacional – UFMG. Disponível em: <http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/benzeno_01.htm>. Acesso em: 27 mar. 2006.

Localização da cidade de Una. Disponível em:
<<http://www.citybrazil.com.br/ba/regioes/ilheusitabuna/>>. Acesso em: 06 dez. 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)