



BACTÉRIAS ISOLADAS DE MANGUES DO RIO COCÓ E DO RIA- CHO DAS GUARIBAS (CE) E SEU POTENCIAL NA DEGRADAÇÃO DE DERIVADOS E CONSTITUINTES DE PETRÓLEO

K.M. Catter¹, R.M. Cavalcante², N.S.E. Barreto³, S. Saker-Sampaio⁴,
E. Hofer⁵ & R.H.S.F. Vieira^{4,*}

¹Doutoranda em Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará (UECE);

²Laboratório de Biogeoquímica Costeira; Instituto de Ciências do Mar-Labomar/UFC, Fortaleza, CE;

³Bolsista de Desenvolvimento Científico e Regional (DCR) FUNCAP/CNPq;

⁴Departamento de Engenharia de Pesca do Instituto de Ciências do Mar-LABOMAR/
Universidade Federal do Ceará

Av. da Abolição nº 3207, Meireles, CEP 60165 -081, Fortaleza, Ceará

⁵Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ

*E-mail: regine@labomar.ufc.br

Recebido em junho de 2006; aprovado para publicação em março de 2007

ABSTRACT

The aim of this study was the isolation and characterization of autochthonous bacteria that are able to utilize petroleum and its derivatives both as sources of carbon and surfactant producers. A total of thirty two strains were isolated from sediment and water samples collected in two mangrove areas at Cocó River, Fortaleza-Ceará-Brazil and at Guaribas River, Pecém-Ceará-Brazil. Seven strains (21.9%) were not identified. Twenty strains (62.5%) were identified as Gram-negative and five as Gram-positive (15.6%). These belong to seven genera: *Acinetobacter* (28%), *Pseudomonas* (20%), *Staphylococcus* (20%), *Burkholderia* (16%), *Flavobacterium* (8%), *Aeromonas* (4%) and *Klebsiella* (4%). All Gram-negative strains: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* were capable of producing surfactants using the drop-collapse technique for surfactant quantitation. The isolated *Staphylococcus* spp and *Burkholderia gladioli* were evaluated for their ability to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) compounds. Seven PAHs namely acenaphthene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo[a]anthracene, dibenz[a,h]anthracene and benzo[g,h,i]anthracene were used to determine the PAH-degrading bacteria activity using gas chromatography (GC). *Staphylococcus* spp (81.2%) and *Burkholderia gladioli* (13.1%) showed best results for degradation of benzo[g,h,i]anthracene, whereas fluoranthene and pyrene were not degraded by any of the isolates. Little is known about the distribution of biosurfactant-producing bacteria in the environment, but culturable surfactant-producing bacteria appeared to be common both in undisturbed and contaminated sites.

Key-words: petroleum derivatives, PAHs, biosurfactant-producing bacteria, mangrove

RESUMO

Este trabalho objetivou isolar e identificar bactérias autóctones, com potencial metabólico de utilizar o petróleo e alguns de seus derivados como fontes de carbono e produzirem surfactantes. Foram isoladas 32 linhagens de amostras de solo e água do mangue do Rio Cocó, em Sabiaguaba - Fortaleza e no mangue do Riacho das Guaribas, na cidade do Pecém.

Foram identificadas 20 cepas (62,5%) Gram negativas e 5 (15,6 %) Gram positivas. Sete (21,9 %) das 32 cepas não foram identificadas. Foram encontrados sete gêneros dentre as 25 cepas identificadas: *Acinetobacter* (28%), *Pseudomonas* (20%), *Staphylococcus* (20%), *Burkholderia* (16%), *Flavobacterium* (8%), *Aeromonas* (4%) e *Klebsiella* (4%). Todas as cepas Gram negativas produziram surfactantes pelo método qualitativo do colapso da gota: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*. Foram escolhidas para um teste desafio *Staphylococcus* spp e *Burkholderia gladioli*. Foram usados sete hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPAs (acenafteno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, dibenzo[a,h]antraceno e benzo[g,h,i]antraceno). A eficiência na degradação desses HPAs pelos microrganismos selecionados foi analisada por cromatografia gasosa. *Staphylococcus* spp apresentou melhor resultado para benzo[g,h,i]antraceno (81,2%) enquanto *Burkholderia gladioli* apresentou apenas 13,1%. Fluoranteno e pireno não foram degradados por nenhuma das bactérias. Conclui-se que facilmente se isola dos mangues estudados, bactérias produtoras de biosurfactantes.

Palavras chave: bactérias, derivados de petróleo HPAs, biosurfactantes, mangues.

INTRODUÇÃO

Os vazamentos de petróleo são importantes fontes de contaminação da água do mar caracterizando-se como grave problema ambiental. No Brasil já foram registrados vários acidentes desse tipo, com conseqüências desastrosas e, muitas vezes, irreversíveis aos ecossistemas.

Vários métodos podem ser utilizados para a remoção de óleo do solo e da água contaminados: físicos, químicos e biológicos. A escolha do melhor tratamento para locais contaminados não segue uma regra geral, sendo cada caso analisado individualmente, avaliando-se suas particularidades (Cunha & Leite, 2000).

Em 1946, ZoBell identificou, pela primeira vez, microrganismos capazes de consumir petróleo, usando-o como fonte de carbono para a geração de biomassa (Rosato, 1997).

Acidentes ecológicos, como o desastre do Exxon Valdez no Alasca em 1989 e o maior derrame de óleo da história, acontecido no Golfo Pérsico durante a Guerra do Golfo, chamaram a atenção para a utilização de microrganismos na degradação de poluentes hidrocarbonados (Aldhous, 1991). Assim, a biorremediação tem-se tornado um método importante a ser empregado na recuperação de ambientes poluídos com óleo (Atlas, 1991).

A degradação do petróleo e /ou de seus derivados é possível, graças à produção de biosurfactantes, agentes ativos de superfície produzidos por certas bactérias, fungos e leveduras, especialmente bactérias (Iqbal *et al.*,1995; Scott & Jones, 2000).

O objetivo da presente pesquisa foi isolar e identificar bactérias autóctones de dois mangues no Ceará (Cocó e Guaribas) capazes de utilizar como única fonte de carbono e energia, quatro substratos (petróleo, querosene, óleo diesel e glicerol) e avaliar o potencial dessas cepas em produzir surfactantes e formar emulsões, além de testar o grau de degradação pelas bactérias selecionadas de alguns compostos aromáticos (HPAs) *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

LOCAL DE COLETA

Foram realizadas duas coletas (maio de 2003) de água e solo no mangue do Rio Cocó, região de Sabiaguaba em Fortaleza – CE (Brasil), local contaminado com óleo por lavagens de barcos; e no mangue do Riacho das Guaribas, município de São Gonçalo do Amarante, Pecém – CE (Brasil), usado como controle, por não apresentar poluição por compostos de hidrocarbonetos (Figuras 1 e 2).

MATÉRIA-PRIMA UTILIZADA NOS TESTES PRELIMINARES

Foram usadas amostras de petróleo cru e óleo diesel doadas pela Refinaria

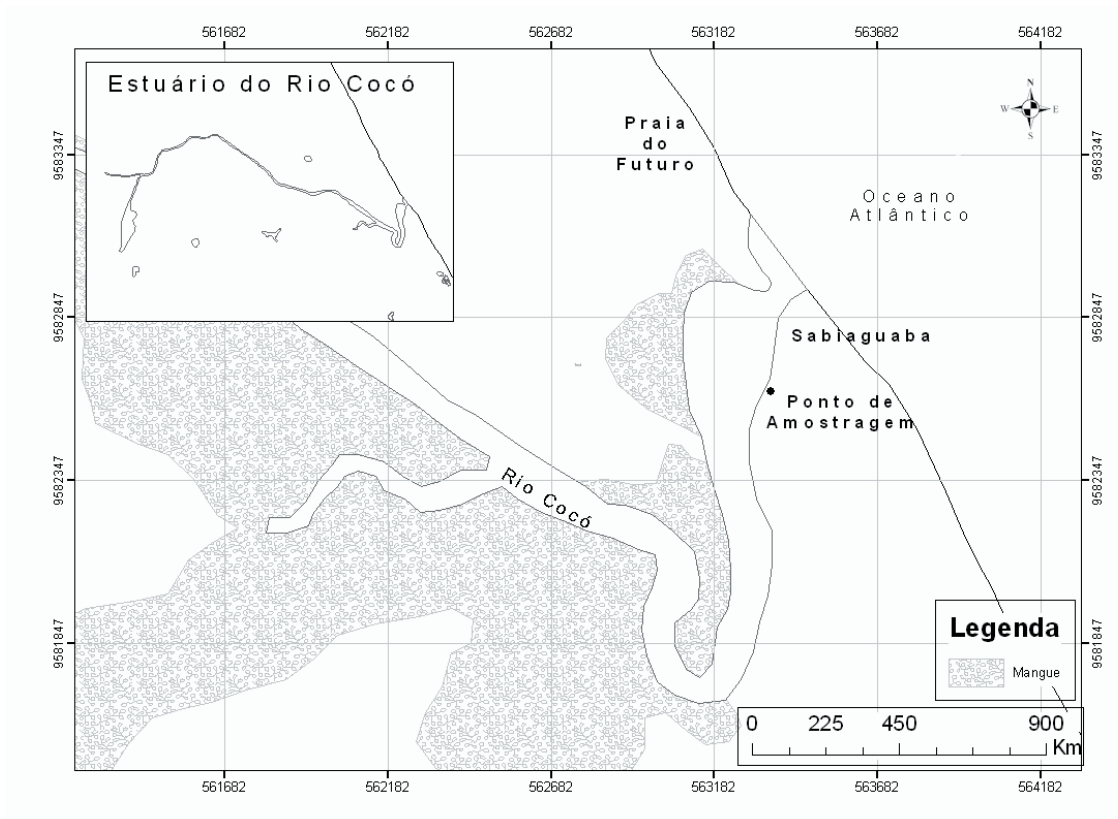


Figura 1: Mapa de localização do ponto de amostragem no Mangue do Rio Cocó, Fortaleza-CE, Brasil.

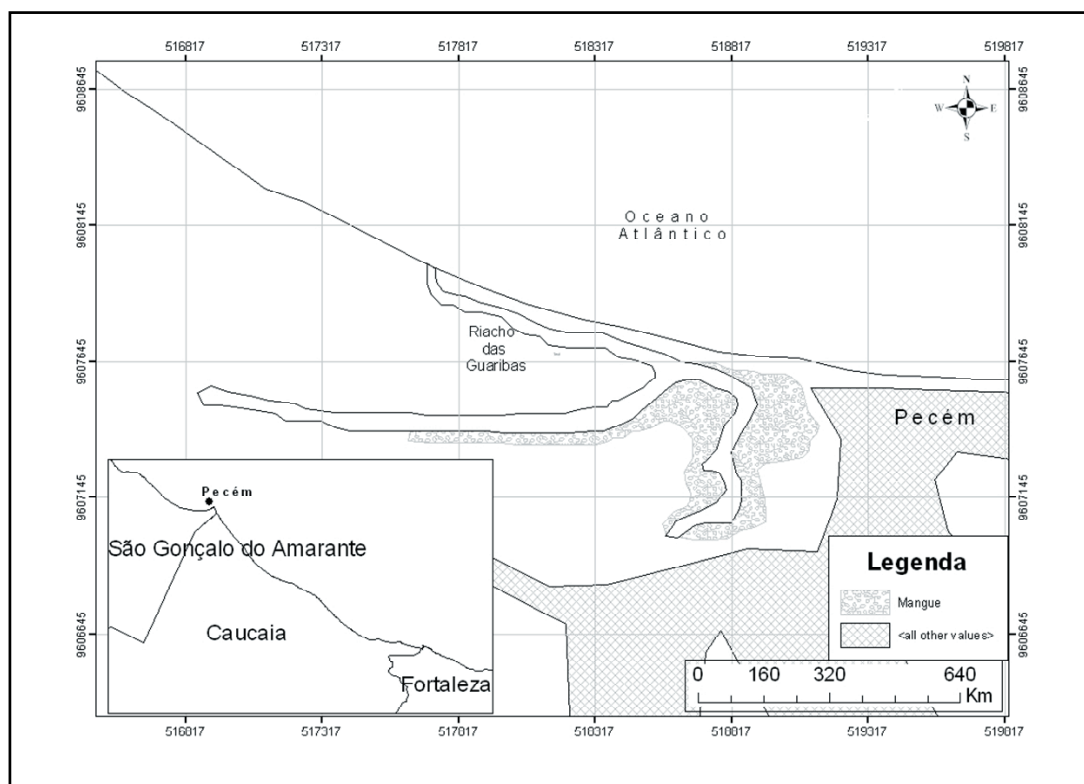


Figura 2: Mapa de localização do ponto de amostragem no Mangue do Riacho das Guaribas, São Gonçalo do Amarante-CE, Brasil

da Petrobras (Lubrificantes e Derivados do Petróleo do Nordeste - LUBNOR); querosene Petrobras, fabricado por Petróleo Brasileiro S.A – Petrobras, e glicerol P.A. redestilado (Reagen). Estes hidrocarbonetos, previamente esterilizados em membrana filtrante (0,22 μm , Millipore), foram adicionados, assepticamente, ao meio de sais minerais segundo Volpon (1992) MM - 0,5g K_2HPO_4 ; 0,5g KH_2PO_4 ; 0,2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,1g NaCl , 0,002g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,5g NH_4NO_3 dissolvidos em 1L de H_2O destilada. Ajustou-se o pH para 7,0 \pm 0,2 e esterilizou-se em autoclave a 121°C por 15 minutos.

COLETA DAS AMOSTRAS

Para a coleta de sedimento foi delimitada uma área (1m), e seis pontos aleatórios foram escolhidos. As amostras (duas) de solo úmido dos seis pontos, formavam um “pool” e eram coletadas em uma profundidade de 1cm, com uma colher esterilizada e colocadas em Erlenmeyer esterilizado.

As amostras de sedimento eram homogeneizadas manualmente, e delas pesadas 10g as quais eram adicionadas em Erlenmeyers contendo MM (volume 98mL do meio MM acrescidos de 2mL de cada substrato) na concentração de 2% (v/v). Petróleo cru, óleo diesel, querosene e glicerol foram usados como única fonte de carbono. Em seguida, os frascos (em duplicata) eram agitados e incubados em aerobiose em estufa a 35°C por 48 horas.

As amostras de água foram coletadas a uma profundidade de aproximadamente 50cm, em garrafas de vidro âmbar e eram transportadas ao laboratório para processamento imediato. A temperatura da água foi medida no local da coleta com um termômetro (Incoterm).

Foram transferidos 10mL das amostras de água para Erlenmeyers, em duplicata, contendo MM, acrescidos de petróleo cru, querosene, óleo diesel e glicerol, como fonte de carbono, na concentração de 2% (v/v). Os frascos foram agitados e incubados em aerobiose por 48 h a 35°C.

PARÂMETROS FÍSICOS QUÍMICOS

A salinidade das amostras de água foi medida no laboratório utilizando-se refratômetro da marca Atago S/Mill e o pH foi medido com um potenciômetro da marca Marconi - PA 200p. Essas medidas foram tomadas em cada vez que foram coletadas as amostras, portanto, representam medidas de uma única vez com duplicatas.

TESTES MICROBIOLÓGICOS E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

Transcorridas 48 horas, foram selecionados os frascos com crescimento, dos quais foi semeada uma alçada no meio, Plate Count Agar - PCA (Merck). As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas.

Foram selecionadas colônias crescidas nas placas que apresentaram aspectos morfológicos diferentes a fim de representar a diversidade bacteriana. As colônias foram inoculadas em tubos de Ágar Triptona Soja - TSA (Merck) inclinados e incubados a 35°C por 24 horas. Os tubos que revelaram crescimento, foram incubados em estufa B.O.D a 23°C. Para a identificação, iniciada pelo exame bacterioscópico através da coloração de Gram, foram identificadas somente as cepas Gram negativas através dos “kits” 20E e 20NE do sistema API, da BioMérieux. Em alguns casos, foram necessários testes complementares para a caracterização da espécie: motilidade; citocromo-oxidase; catalase; oxidação-fermentação (O/F) da glicose; crescimento a 10 e 44°C, assimilação de fenilalanina; DNase; indol e H_2S (Krieg *et al.*, 1984).

TESTE DO COLAPSO DA GOTA

O potencial das cepas identificadas para degradar derivados do petróleo e produzir biossurfactantes foi analisado mediante o teste qualitativo do colapso da gota (Bodour & Miller-Maier, 1998).

CAPACIDADE DE FORMAÇÃO E ESTABILIDADE DE EMULSÃO

Para avaliar a capacidade dos isolados em produzir biossurfactantes e em formar emulsão, seguiu-se a metodologia de Das *et al.* (1998). A estabilidade da emulsão (% ES)

foi quantificada pela fórmula (FENNEMA, 1985). Esta avaliação foi realizada com duas repetições para cada isolado, sendo que cada repetição foi realizada em triplicata. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura (MM) sem inóculo tratado nas mesmas condições.

BIODEGRADAÇÃO DE HPAS (TESTE DESAFIO)

Para o estudo da degradação de HPAs foi realizado um teste desafio realizado em duas etapas:

1ª ETAPA

Cinco cepas de quatro diferentes gêneros foram escolhidas para esta etapa: *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia gladioli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* e *Staphylococcus* spp. A quantidade do inóculo inicial foi medido através da Escala de McFarland. O tubo usado para comparação foi o de 0,5 que, segundo Hindler & Jorjensen (1995), equivale a 108 UFC/ml da bactéria a ser testada. Estas foram inoculadas em água de mangue previamente filtrada e esterilizada. Frascos em duplicatas contendo 30 mL da solução de uma mistura de sete HPAs, acenafiteno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, dibenzo [a,h] antraceno e benzo [g,h,i]antraceno em água Milli-Q, na concentração de 10mg/L foram adicionados. Como controle foram utilizados, em duplicata, o meio sem inóculo bacteriano. As amostras foram protegidas da luz e incubadas à temperatura ambiente sob agitação contínua. Após 21 dias as amostras foram retiradas da agitação e os HPAs remanescentes extraídos segundo o método da edição SW-846 da USEPA (2005). A quantificação foi através da técnica de cromatografia gasosa.

2ª ETAPA

Nesta etapa utilizamos cepas que obtiveram resultados satisfatórios na 1ª fase: *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas fluorescens* e um consórcio dessas duas bactérias inoculadas em água de mangue nas mesmas condições da fase anterior. Foi utilizada uma solução com quatro HPAs: fenantreno, antraceno, fluoranteno e pireno

a uma concentração de 10 mg/L. Nesta fase as amostras foram retiradas da agitação após 7 dias e os HPAs analisados.

ANÁLISE, RECUPERAÇÃO E EFICIÊNCIA DE BIODEGRADAÇÃO DE HPAS

A determinação quantitativa dos HPAs foi feita através da técnica de cromatografia gasosa utilizando um cromatográfico gasoso, modelo CG17A-Shimadzu, interfaciado com um detector de ionização por chama (DIC), acoplado com uma coluna DB-5 J&W Scientific (30mm x 0,25mm i.d. x 0.25µm de fase). A temperatura de programação teve início a 80°C permanecendo por 5 min, aumentando a 120°C a uma taxa de 30°C/min, após aumentando para 230°C a uma taxa de 5°C/min, finalizando com o aumento da temperatura para 305°C a 3°C/min. Foram injetados 2µL da amostra no modo split (1:20), utilizando hidrogênio como gás de arraste a um fluxo de 1,0 mL/min.

Foram analisadas as soluções matrizes, brancas de bactéria e inoculadas. A eficiência da biodegradação (EF) promovida pelas bactérias foi calculada a partir da análise de recuperação dos HPAs nas amostras inoculadas, segundo a massa, calculados na equação abaixo.

$$EF = \frac{\text{analito após biodegradação}}{\text{analito adicionado}} \times 100$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 32 cepas, sendo 16 do mangue do Rio Cocó e 16 do mangue do Riacho das Guaribas. Dessas, 24 (75%) eram Gram negativas e oito (25%) Gram positivas, incluindo bastonetes e cocos. Das 24 cepas Gram negativas, 20 foram identificadas (62,5%), três cepas (9,4%) não foram identificadas pelos “kits” da bioMérieux e uma (3,2%) não apresentou crescimento. Das cepas Gram positivas, cinco (15,6%) foram identificadas em nível de gênero e três não foram identificadas (9,37%).

Foram identificadas bactérias Gram negativas pertencentes a seis gêneros

enquanto que as Gram positivas pertencentes a um só gênero. As espécies predominantes pertenciam aos gêneros *Acinetobacter* e *Pseudomonas*, representando um valor de 28% e 20%, respectivamente. Vale ressaltar que a capacidade desses dois gêneros em metabolizar os hidrocarbonetos de petróleo e seus derivados, como única fonte de carbono, é um mecanismo bem estudado (Ron & Rosenberg, 2002).

O gênero *Acinetobacter*, o mais incidente nos isolados das amostras (35%), era representado por cinco cepas de *A. baumannii*, uma de *A. calcoaceticus* e uma identificada somente até gênero. O gênero *Acinetobacter* é objeto de várias pesquisas devido a sua grande importância na biotecnologia aplicada ao meio ambiente (Rosenberg & Ron, 1997).

A espécie predominante, entre as identificadas, foi: *A. baumannii*, com um percentual de 20%, seguida por duas cepas de *Burkholderia cepacia*, duas de *Burkholderia gladioli* e duas de *Pseudomonas fluorescens* com 8%, e as demais espécies foram identificadas somente uma cepa de cada: *A. calcoaceticus*, *Acinetobacter* spp, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium odoratum*, *F. thalopophilum*, *Klebsiella planticola*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida* e *P. stutzeri*, com a contribuição de 5%.

O gênero que participou com a maior diversidade de espécies (quatro) foi *Pseudomonas*: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* e *P. stutzeri*. Richard & Vogel (1999) também isolaram de amostras de sedimentos, sem história de disposição de hidrocarbonetos, cinco espécies de *Pseudomonas*. Da mesma maneira, Ururahy *et al.* (1998) isolaram várias espécies de *Pseudomonas* em sedimento coletado próximo a uma refinaria no Rio de Janeiro.

Das amostras de água dos dois mangues foram isoladas: *F. odoratum*, *B. cepacia*, *Acinetobacter* spp, *A. baumannii*, *Pseudomonas stutzeri*, *P. putida* e *P. fluorescens* (Tabelas 1 e 2). Os gêneros

Nocardia, *Pseudomonas* e *Flavobacterium* são os mais significativos na atividade degradativa para algumas frações do petróleo cru. Normalmente, estes organismos se encontram presentes em pequenas cifras (10 UFC/mL) em águas oceânicas, podendo chegar a 10⁶ UFC/g em sedimentos

Tabela 1: Origem, fonte de carbono e microrganismos identificados nas amostras de água e solo coletadas no Mangue do Rio Cocó, Fortaleza, Ceará.

Fonte	Microrganismo
Água	
Petróleo	<i>Flavobacterium odoratum</i>
Petróleo	<i>Staphylococcus</i> spp
Diesel	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Diesel	<i>Pseudomonas putida</i>
Querosene	<i>Burkholderia cepacia</i>
Querosene	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
Glicerol	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Solo	
Petróleo	<i>Burkholderia gladioli</i>
Diesel	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Querosene	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Querosene	<i>Flavobacterium thalopophilum</i>
Glicerol	<i>Klebsiella planticola</i>

Tabela 2: Origem, fonte de carbono e microrganismos identificados nas amostras de água e solo coletadas no Mangue do Riacho das Guaribas, Ceará.

Fonte	Microrganismo
Água	
Petróleo	<i>Acinetobacter</i> spp
Diesel	<i>Staphylococcus</i> spp
Diesel	<i>Staphylococcus</i> spp
Querosene	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Glicerol	<i>Staphylococcus</i> spp
Glicerol	<i>Staphylococcus</i> spp
Solo	
Petróleo	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Petróleo	<i>Burkholderia gladioli</i>
Diesel	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Querosene	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Querosene	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Glicerol	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Glicerol	<i>Burkholderia cepacia</i>

estuarinos contaminados de petróleo (Grant & Long, 1998).

Cinco bactérias isoladas nos mangues Cocó e Guaribas utilizaram o petróleo como única fonte de carbono e energia: *Flavobacterium odoratum*, *Burkholderia gladioli* (duas cepas), *Acinetobacter* spp e *A. baumannii*. Quatro assimilaram o diesel: *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. A maior parte das bactérias isoladas (sete) utilizou o querosene como única fonte de carbono: *Burkholderia cepacia*, *P. stutzeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium thalopophilum*, *P. fluorescens*, *A. baumannii* e *A. calcoaceticus* e quatro foram capazes de utilizar o glicerol: *A. baumannii* (duas cepas), *Klebsiella planticola* e *B. cepacia*. *A. baumannii* foi a única espécie capaz de crescer em todos os substratos.

O Rio Cocó sofre degradações por ações naturais e antrópicas ao longo do seu curso então, é possível, que as bactérias indígenas desta região já estejam adaptadas à contaminação por compostos oleosos. Em contrapartida, o 2o ponto de coleta, localizado na planície fluviomarina onde está situada a foz do Riacho das Guaribas ainda não sofreu este tipo de impacto. Silva *et al.* (2000) monitoraram as águas próximas à construção do Porto do Pecém no sentido de detectar a presença de óleos e graxas e as análises laboratoriais indicaram a ausência destes em todos os pontos de coleta.

Os resultados dos parâmetros físico-químicos, estudados nas águas do mangue do Rio Cocó e no mangue do Riacho das Guaribas, estão apresentados na Tabela 3.

A temperatura influencia na biodegradação pelo efeito na natureza física

e química do petróleo, bem como seleciona a população microbiana. Em geral, em baixas temperaturas, a viscosidade do óleo aumenta e a volatilização dos alcanos de cadeia curta diminui, o que leva a um processo de biodegradação mais lento (Atlas, 1981).

Outro fator a ser considerado na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo é o pH, pois a maioria das bactérias e fungos apresenta um melhor desenvolvimento em pH próximo da neutralidade (Rosato, 1997).

O pH medido nas águas das duas procedências foi: 7,39 (Cocó) e 6,87 (Guaribas) (Tabela 3). Para a maioria das bactérias e fungos, o pH ótimo é ligeiramente alcalino (Pedrozo *et al.*, 2002). Conforme Atlas (1981), com o aumento da salinidade há um decréscimo na biodegradação de compostos oleosos, devido a uma redução no metabolismo dos microrganismos.

Das 13 cepas identificadas (12 espécies e um gênero bacteriano) avaliadas pelo método qualitativo do colapso da gota, todas (100%) mostraram capacidade de produzir surfactantes, sendo que sete (53,8%) delas excretaram-no para o meio de cultura.

Jain *et al.* (1991) testaram a estabilidade das gotas na presença de células de *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* e elas se mostraram instáveis, ou seja, foram capazes de produzir biosurfactantes. Em contrapartida, *Acinetobacter calcoaceticus* e *Escherichia coli* mostraram-se estáveis, indicando a ausência ou baixas concentrações de surfactantes produzidos. A estabilidade das gotas depende da concentração de biosurfactantes e tem correlação com a tensão superficial.

Tabela 3: Parâmetros físico-químicos das amostras de água coletadas no mangue do Rio Cocó e no mangue do Riacho das Guaribas, Ceará.

Parâmetros	Mangue Rio Cocó	Mangue Riacho das Guaribas
Temperatura (°C)	29	29
pH	7,39	6,87
Salinidade (‰)	16	Zero

Treze estirpes testadas mostraram capacidade para formar emulsões com querosene através do teste quantitativo. Uma cepa de *Staphylococcus* spp, não identificada até espécie, não apresentou esta habilidade. Das bactérias testadas, 84,6% formaram emulsões consideradas estáveis, segundo critérios citados por Willumsen & Karlson (1997).

As espécies *Flavobacterium thalophilum* e *F. odoratum* não mantiveram estabilidade além das 48 horas de ensaio e nem foram capazes de formar emulsões acima de 40% (Bosch *et al.*, 1988), até as 168 horas de acompanhamento do experimento.

Na degradação do Benzo [g,h,i]antraceno, cinco cepas da linhagem de *Staphylococcus* spp apresentaram os melhores resultados (81,2%), seguidas de *Pseudomonas fluorescens* (61,5%), *P. putida* (47,3%), *Acinetobacter baumannii* (37,9%) e *Burkholderia gladioli* (13,1%). As cepas testadas não foram capazes de degradar o fluoranteno e o pireno (Figura 3).

Segundo Okpokwasili & Nweke (2003) e Harayama *et al.* (2004), cepas de *Staphylococcus aureus* têm capacidade de degradar hidrocarbonetos do petróleo; o potencial dessas cepas foi testado frente ao naftaleno, um HPA presente em águas e solos contaminados.

Na 2a etapa do teste desafio as duas cepas testadas (*Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas fluorescens* exibiram bons resultados, principalmente a cepa de *A. baumannii* que apresentou percentuais de biodegradação de 79,2%, 79,3%, 79,4% e 99,8% para fenantreno, antraceno, fluoranteno e pireno, respectivamente (Figura 4).

O consórcio testado neste estudo revelou percentuais mais baixos comparado com as cepas separadamente. O resultado encontrado pode sugerir que estas cepas competiram entre si.

Guo *et al.* (2005) testaram a habilidade de dois consórcios bacterianos em degradar compostos HPAs. No primeiro foram utilizadas: *Rhodococcus* sp e *Sphingomonas* sp durante

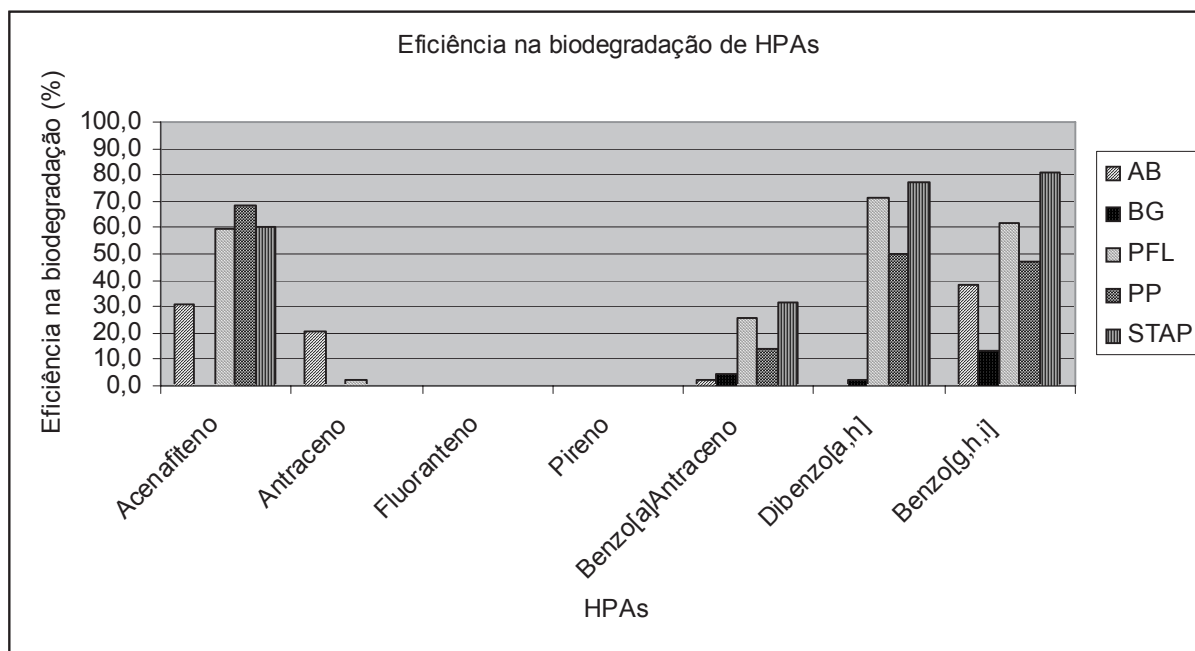


Figura 3: Percentual da biodegradação de HPAs (acenafiteno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, dibenzo [a,h]antraceno, benzo[g,h,i]antraceno) pelas cepas: *Acinetobacter baumannii* (AB); *Burkholderia gladioli* (BG); *Pseudomonas fluorescens* (PFL); *Pseudomonas putida* (PP); *Staphylococcus* spp (STAP).

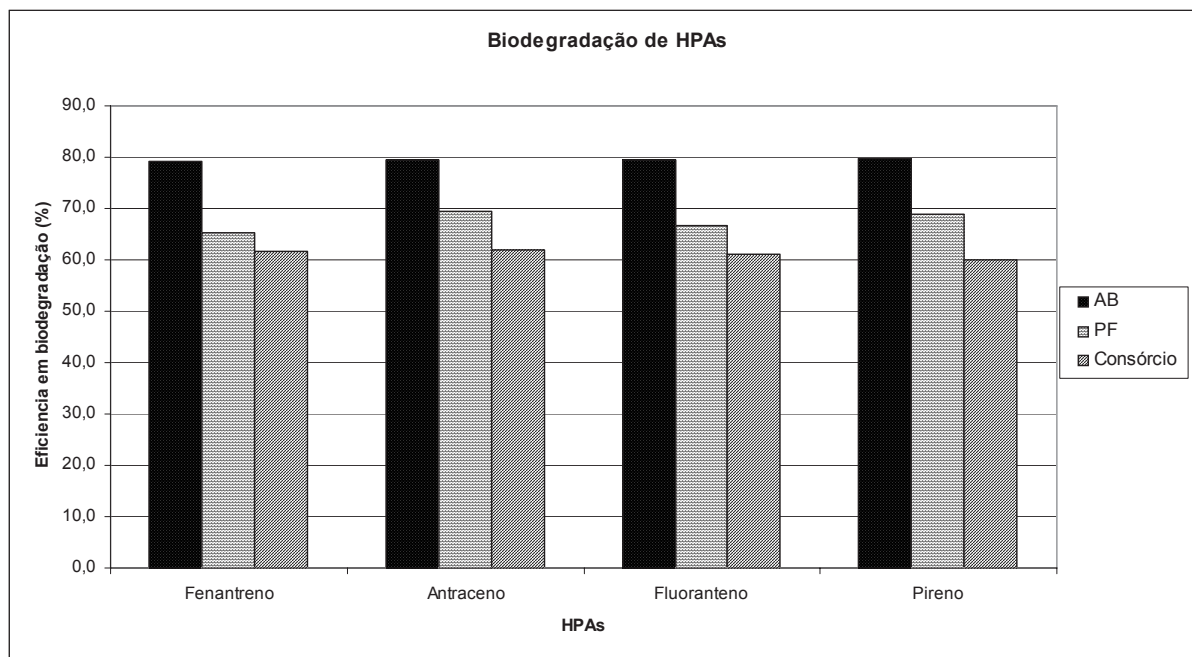


Figura 4: Percentual da biodegradação de HPAs (fenantreno, antraceno, fluoranteno e pireno) pelas cepas de *Acinetobacter baumannii* (AB), *Pseudomonas fluorescens* (PF) e *A.baumannii* + *P. fluorescens* (Consórcio).

uma semana de incubação, frente a uma mistura de três HPAs: fenantreno, fluoranteno e pireno, os quais foram completamente degradados. O segundo consórcio realizado com bactérias não identificadas pelos autores e com as mesmas condições de cultivo já citadas, apresentou uma baixa capacidade em degradar a mesma mistura de HPAs, indicando, portanto, que culturas utilizando uma mistura de microrganismos possuem diferentes potenciais para degradar HPAs.

como do mangue do Riacho das Guaribas. As cepas identificadas se mostraram boas produtoras de biosurfactantes e o maior potencial de emulsificação e de estabilização das emulsões formadas, foi encontrado nas linhagens pertencentes aos gêneros, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. Além disto, *Staphylococcus* spp, *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter baumannii* foram as linhagens que apresentaram uma maior eficiência na degradação de HPAs.

CONCLUSÕES

Conclui-se que foi possível isolar bactérias degradadoras de compostos de petróleo tanto do mangue do Rio Cocó,

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o CNPq/CT-PETRO pelo financiamento desta pesquisa e pela bolsa (DTI) concedida à Karla Maria Catter.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDHOUS, P. (1991) Gulf oil-spill - Big test for bioremediation. *Nature*, 349: 447.
- ATLAS, R.M. (1991) Microbial hydrocarbon degradation – Bioremediation of oil-spills. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 52:149-156.
- ATLAS, R.M. (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiology Reviews*, 45: 180-209.
- BODOUR, A.A.; MILLER-MAIER, R.M. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal Microbiology Methods*, 32: 273-280.

- BOSCH, M.P.; ROBERT, M.; MERCADÉ, M.E.; ESPUNY, M.J.; PARRA, J.L.; GUINEA, J. (1988) Surface-active compounds on microbial cultures. *Tenside Surfactants & Detergents*, 25: 208–211.
- CUNHA, C.D.; LEITE, S.G.F. (2000) Gasoline biodegradation in different soil microcosms. *Brazilian Journal Microbiology*, 31: 45–49.
- DAS, M.; DAS, S.K.; MUKHERJEE, R.K. (1998) Surface active properties of the culture filtrates of a *Micrococcus* species grown on n-alkanes and sugars. *Bioresources Technology*, 63: 231-235.
- FENNEMA, O.R. (1985) *Food Chemistry*. 2. ed. Nova York: Food Science and Technology, 991p.
- GRANT, W.D.; LONG, P.E. (1989) *Microbiologia Ambiental*. Zaragoza: Editorial Acribia,. 232p.
- GUO, C.L.; ZHOU, H. W.; WONG, Y.S.; TAM, N.F.Y. (2005) Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. *Marine Pollution Bulletin*, 51:1054-1061.
- HARAYAMA, S.; KISHIRA, H.; KASAI, Y.; SHUTSUBO, K. (2004) Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of Molecular Microbiology & Biotechnology*, 1: 63-70.
- HINDLER, J.A.; JORGENSEN, J. H. (1995) Procedures in antimicrobial susceptibility testing. In: C.R Mahon, G Manuseelis, eds. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Pennsylvania: W.B. Saunders Company.
- IQBAL, S.; KHALID, Z.M.; MALIK, K.A. (1995) Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma- ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Microbiology*, 21:176-179.
- JAIN, D.K.; COLLINS-THOMPSON, D.L.; LEE, H.; TREVORS, J.T. (1991) A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *Journal Microbiology Methods*, 13: 271-279.
- KRIEG, N.R.; HOLT, J.G.; eds. (1984) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. v.1. Baltimore–USA: Willians & Wilkins.
- OKPOKWASILI, G.C.; NWEKE, C.O. (2003) Driling fluid base oil biodegradation potential of a soil *Staphylococcus* species. *African Journal of Biotechnology*, 21:215-220.
- PEDROZO, M.F.M.; BARBOSA, E.M.; CORSEUIL, H.X.; SCHNEIDER, M.R.; LINHARES, M.M. (2002) *Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo*. Salvador: Centro de Recursos Ambientais, 246p.
- RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M. (1999) Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *International Journal of Biodeterioration and Biodegradation*, 44: 93-100.
- RON, E.Z.; ROSENBERG, E. (2002) Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinions in Biotechnology*, 13:249–252.
- ROSENBERG E.; RON, E.Z. (1997) Bioemulsans: microbial polymeric emulsifiers. *Current Opinions in Biotechnology*, 8: 313–316.
- ROSATO, Y.B. (1997) Biodegradação do Petróleo. Cap. 14. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. *Microbiologia ambiental*. Brasília: EMBRAPA, p. 307-334.
- SCOTT, M.J.; JONES, M.N. (2000) The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica & Biophysica Acta*, 1508: 235–251.
- SILVA, P.R.F.G.; PLATONOV, A.K.; VIEIRA, R.H.S.F. (2000) Monitoramento das águas da

área de construção do porto do Pecém e sua zona de influência direta (Estado do Ceará, Brasil). Arquivos de Ciências do Mar, 33:165–171.

URURAHY, A.F.P.; MARINS, M.D.M.; VITAL, R.L.; GABARDO, I.T. (1998) Effect of aeration on biodegradation of petroleum waste. Reviews in Microbiology, 29:254–258.

US Environmental Protection Agency (USEPA) SW-846 On-line test methods for evaluating solid wastes physical/chemical methods. Acessado em abril de 2005.

VOLPON, A.G.T. (1992) Evidências de bactérias em rochas petrolíferas. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 127p.

WILLUMSEN, P.A.; KARLSON, U. (1997) Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. Biodegradation, 7 : 415–423.

(Footnotes)

¹To whom the correspondence should be sent: regine@labomar.ufc.br