

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS
BIOATIVOS**

**Biodegradabilidade de n-Hexadecano por Bactérias Livres
e Imobilizadas em Quitosana**

Samantha Pinheiro da Costa

Recife - 2006

Samantha Pinheiro da Costa

Biodegradabilidade de n-Hexadecano por Bactérias Livres e Imobilizadas em Quitosana

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos, Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Produtos Bioativos.

Orientadoras: Prof^a. Maria de Fátima Vieira de Queiroz Sousa, D.Sc.
Prof^a. Vânia Maria Maciel Melo, D. Sc.

Recife - 2006

Costa, Samantha Pinheiro da
Biodegradabilidade de n-Hexadecano
por bactérias livres e imobilizadas em
Quitosana / Samantha Pinheiro da Costa.
– Recife : O Autor, 2006.
ix, 100 folhas : il., fig., fotos, tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos, 2006.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Microbiologia – Biodegradação. 2. Petroderivados – n-Hexadecano – *Bacillus pumilus*.
3. Imobilização de microrganismo - Quitosana – Biorremediação. I. Título.

579.85
579.362

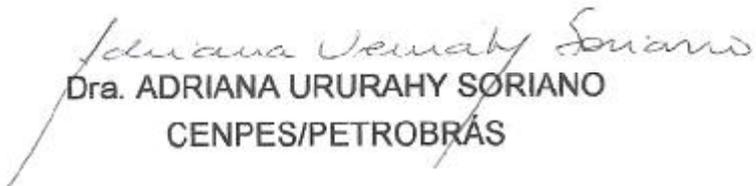
CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

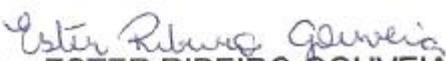
UFPE
BC2006-220

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR SAMANTHA PINHEIRO DA COSTA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 24 DE MARÇO DE 2006 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:


Dra. ADRIANA URURAHY SORIANO
CENPES/PETROBRÁS


Dra. ESTER RIBEIRO GOUVEIA
Departamento de Antibióticos - UFPE


Dra. NORMA BUARQUE GUSMÃO
Departamento de Antibióticos - UFPE

Dedico esta dissertação à Prof^a. Dra. Vânia Maria Maciel Melo, da Universidade Federal do Ceará pelo seu empenho como orientadora, seu domínio e sua segurança, que me fizeram crescer e poder realizar este trabalho e à todos meus amigos do LAMI pela agradável companhia.

Agradecimentos

A Deus em especial, por me permitir concluir esta caminhada,

À Prof^a. Vânia por ter aberto as portas de seu laboratório e de seu coração para me receber, orientar e dedicar seu tempo a longas conversas descontraídas....

À Prof^a. Fátima pelo apoio à distância, pelas análises e apresentações concedidas e pelas correções da dissertação.

Ao Paulinho por ter me mostrado nestes anos de namoro que a sinceridade e a justiça ainda fazem parte deste mundo. Além de ter participado e tornado possível às experiências vividas nestes dois anos em Recife, que foram sem dúvida os melhores e mais felizes momentos da minha vida, depois da morte de minha mãe.

Aos meus irmãos: Gláucio, Serginho e Geórgia que mesmo na ausência de nossos pais, fazem de nossa família uma família unida, e que mesmo sem entender “bulhufas” do que executo em meu trabalho, me escutam e se esforçam para compreender.

Às minhas sobrinhas Sasha, Alexandrina, Maria Vitória, Marina, Lucas (ainda por nascer) e Larissa (sobrinha torta) por serem a razão da minha vida.

Às spicy: Fernanda, Helen, Jacira, Luciana e Sandra pelo convívio harmonioso e pelos milhares exemplos de sincera amizade e felicidade... Amo muito vocês amigas de coração.

À Luzia, por ter sempre cuidado de mim com muito carinho, exemplo de doação ao próximo.

Às amigas Francilena e Carísia por abrilhantarem com sua presença minha vida e pelo exemplo de amizade e perseverança.

Aos meus amigos do LAMI (Laboratório de Microbiologia e Imunologia da UFC): Alysson, Caio, Denise, Durcileide, Fernanda, Genilton, Júlio, Lidiane, Natasha, Raphaela, Simone, Tatiane, Vanessa, Viviane e aos “microfisiologistas” André e Davi por tornarem as idas ao trabalho extremamente prazerosas e felizes, amigos adorei ter conhecido todos vocês e vocês fazem parte da minha vida daqui para frente, podem ter certeza.

À turma do pó-de-guaraná (Alysson e Caio) pelas tardes maravilhosas ao lado daquela senhora encantadora do pó...

Ao restante das amigas cearenses (Danise, Melissa e Laís), por termos compartilhado alegrias durante estes dois anos de convívio.

Aos meus amigos de Recife (André Hime, Rodrigo, Toinho, Milany, Massuhamy, Cláudio, D. Dal, Sr. Paulo Coe, Tati, Ciba, Carol, Rosinha, Juliana) por terem feito eu me apaixonar por vocês e conseqüentemente por Recife.

Aos amigos do Padetec pelo apoio durante as análises e conversas agradáveis: Tecia e Ricardo.

À Rivalda pelo seu empenho ao laboratório e por ter sempre auxiliado a todos com tanto carinho.

Aos colegas do curso de mestrado por serem pessoas especiais, sinceras e amigas: Cleyton, Cynthia, Fábio, Fernanda Borba, Fernanda Vaz, Rosa e Vânia.

Aos colegas do Laboratório da Universidade Federal de Pernambuco: Rita, Cynthia, Breno, Pérsio, Manuela, Gleicy e Edelvio, pelo apoio paralelo à distância e pelas dúvidas retiradas.

A todas as pessoas que me ajudaram a solucionar problemas e retirar dúvidas: prof. Irapuan (UFPE), prof. Ronaldo (UFC), prof. Afrânio (Padetec), César (Padetec), Gustavo (Embrapa CNPAT).

Ao CNPQ pela bolsa de estudos concedida durante todo o curso.

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

Às Instituições: Universidade Federal do Ceará, em especial ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Ciências Biológicas e ao Laboratório de Processos Fermentativos II do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco pelo convênio realizado entre as Instituições e pelas instalações fornecidas para a execução deste projeto.

A todos aqueles demais que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. – INTRODUÇÃO.....	1
1. – OBJETIVOS.....	4
2. – REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1 – Petróleo e seus Derivados.....	7
2.2 – Biorremediação.....	7
2.3 – Biodegradação de Hidrocarbonetos.....	8
2.4 – Microrganismos Degradores de Hidrocarbonetos.....	9
2.5 – Biodegradação de Hidrocarbonetos no Mar.....	10
2.6 - Biodegradação de Hidrocarbonetos no Solo.....	11
2.7 - Respostas Fisiológicas e Comportamentais em Resposta a Hidrocarbonetos: Alterações nas Membranas Celulares.....	12
2.8 – Biossurfactantes – Funções e Aplicações.....	15
2.9 – Aspectos Bioquímicos da Biodegradação Aeróbica de Hidrocarbonetos.....	18
2.9.1 – Vias Bioquímicas para a Biodegradação Aeróbica de Hidrocarbonetos.....	19
2.10 – Fatores que Influenciam na Biodegradação.....	21
2.10.1 – Temperatura.....	21
2.10.2 – Nutrientes.....	22
2.10.3 – Oxigênio.....	22
2.10.4 – Outros fatores.....	22
2.11 – Aspectos Genéticos da Biodegradação.....	23
2.12 – Imobilização de Células e Enzimas.....	23
2.13 – Métodos de Imobilização de Células e Enzimas.....	24
2.14 – Uso de Células Aprisionadas em Aplicações Ambientais.....	28

2.15 – Imobilização por Quitosana.....	30
3. – MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 – Fonte de carbono.....	35
3.2 – Microrganismos.....	35
3.3 – Manutenção das Linhagens Bacterianas.....	36
3.4 – Seleção de Bactérias Degradadoras de n-Hexadecano.....	36
3.5 – Curva de Crescimento das Linhagens Seleccionadas.....	36
3.6 – Identificação das Linhagens Bacterianas Seleccionadas.....	37
3.7 – Crescimento das Linhagens UFPEDA 831 e UFPEDA 840 em diferentes Concentrações de n-Hexadecano.....	39
3.8 – Ensaio de Adesão Bacteriana a Hidrocarbonetos.....	39
3.9 – Caracterização da Quitosana em Flocos.....	40
3.10 – Avaliação do Efeito da Quitosana Sobre as Linhagens Seleccionadas.....	41
3.11 – Pesquisa de Atividade Quitosanásica.....	41
3.12 - Preparação das Esferas (<i>Beads</i>) de Quitosana com a Linhagem Seleccionada Imobilizada.....	43
3.13–Resistência da Linhagem Seleccionada a Variações de pH.....	43
3.14 – Ensaio de Biodegradação com Células Livres.....	44
3.15 – Teste de Emulsificação.....	44
3.16 – Determinação de Proteína.....	45
3.17 – Determinação de Carboidratos.....	45
3.18 – Atividade Hemolítica.....	45
3.19 – Quantificação da Densidade Celular.....	46
3.20 – Análises Cromatográficas.....	46
3.21 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	47
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 – Seleção das Linhagens Biodegradadoras de n-Hexadecano.....	50
4.2 – Identificação das Linhagens Bacterianas.....	53
4.3 – Antibiograma.....	58
4.4 – Crescimento das Linhagens <i>Bacillus pumilus</i> e <i>Ochrobactrum anthropi</i> em Diferentes Concentrações de n-Hexadecano.....	58
4.5 – Verificação da Hidrofobicidade Celular.....	62

4.6 – Imobilização da Bactéria em Quitosana.....	63
4.7–Parâmetros Avaliados Durante a Biodegradação com Células Livres e Imobilizadas.....	66
4.8 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	73
5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES	82
5.1 – Conclusões.....	83
5.2 – Sugestões	84
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
7 – ANEXO (Cromatogramas).....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Degradação e Assimilação de Diferentes Hidrocarbonetos por Bactérias Não-esporuladas (<i>Actinomycetes</i>), sendo seu mecanismo adaptado em resposta à disponibilidade de hidrocarbonetos e com a produção de uma grande variedade de lipídeos com diferentes complexidades e funções.	15
Figura 2.2	Degradação de Alcanos : Ação da Monooxigenase e β -oxidação (MAIER, 2000).	20
Figura 2.3	Degradação de Alcanos- Oxidação Mono e Subterminal (MAIER, 2000).	21
Figura 2.4	Principais Métodos de Imobilização (Bickerstaff, 1997).	25
Figura 2.5	Estrutura Química da Celulose (a), Quitina (b) e da Quitosana (c)	31
Figura 4.1	Crescimento das Quarenta e uma Linhagens Bacterianas em n-Hexadecano a 1 %.	51
Figura 4.2	Crescimento das Linhagens Seleccionadas, UFPEDA 831 e UFPEDA 840, em Glicose e em n-Hexadecano.	52
Figura 4.3	Curva de Crescimento da Linhagem UFPEDA831 e UFPEDA 840 em TSB, Durante 19 horas à temperatura ambiente sob Agitação de 160 rpm.	
Figura 4.4	Aspecto Colonial e Resposta Tintorial ao Gram das Bactérias <i>B. pumilus</i> (a,b) e <i>O. anthropi</i> (c,d). Detecção de Esporos em <i>B. pumilus</i> , em verde (e)	52 57
Figura 4.5	Crescimento da Bactéria <i>B. pumilus</i> em Diferentes Concentrações de n-Hexadecano em Diferentes Tempos	59
Figura 4.6	Crescimento da Bactéria <i>O. anthropi</i> em Diferentes Concentrações de n-Hexadecano em Diferentes Tempos	59
Figura 4.7	Aspecto do Ensaio de Biodegradação em Tubos, Utilizando a Bactéria <i>B. pumilus</i> : a) Tempo zero e b) Após Sete Dias.	60
Figura 4.8	Atividade Hemolítica (I) e Aspectos da Emulsificação de Querosene (II) Promovidos Pelas Culturas de (a) <i>B. pumilus</i> e (b) <i>O. anthropi</i> .	61
Figura 4.9	Ensaio de Avaliação do Efeito da Quitosana Sobre as Linhagens: a) <i>O. anthropi</i> e b) <i>B. pumilus</i> Ambas com 1 h e 24 Horas de Incubação em Quitosana (1 a 4 %)	63
Figura 4.10	Atividade Quitosanásica em <i>B. pumilus</i> e <i>O. anthropi</i> .	64

Figura 4.11	Aspecto Geral dos <i>Beads</i> de Quitosana com Células de <i>B. pumilus</i> Aprisionadas (a, b): Diâmetro dos <i>Beads</i> Produzidos.	65
Figura 4.12	Aspecto da Biodegradação com Células Livres de <i>B. pumilus</i> nos Tempos: a) Zero e b) Após Seis Dias de Incubação a 160 rpm, a 25 °C	68
Figura 4.13	Aspecto da Biodegradação com Células de <i>B. pumilus</i> Imobilizadas em Quitosana nos Tempos: a) Zero e b) Após Seis Dias de Incubação a 160 rpm, a 25 °C.	69
Figura 4.14	Aspecto Geral da Ultraestrutura de <i>Bacillus pumilus</i> na Forma Livre (a,b)	74
Figura 4.15	Eletromicrografias de Esferas Submetidas à Secagem em Estufa a 35 °C A1- Esfera Controle Intacta; A2 idem A1; A3 – Esfera Seccionada; A4 idem A3.	75
Figura 4.16	Eletromicrografias de Esferas com <i>Bacillus pumilus</i> Submetidas à Secagem em Estufa a 35 °C A1- Esfera Controle Intacta; A2 idem A1; A3 – Esfera Seccionada; A4 idem A3.	76
Figura 4.17	Eletromicrografias de Esferas Submetidas à Liofilização, Após Congelamento a - 20 °C A1- Esfera Controle Intacta; A2 idem A1; B1 – Esfera com Bactérias, Intacta; B2, B3 e B4 idem B1.	77
Figura 4.18	Eletromicrografias de Esferas Submetidas à Liofilização, Após Congelamento a - 20 °C. A1- Esfera Incubada com Bactérias, seccionada; A, A3 e A4 idem A1.	78
Figura 4.19	Eletromicrografias de Esferas Submetidas à Liofilização, Após Congelamento em Nitrogênio Líquido. A1- Esfera Controle Intacta; A2 e A3 idem A1; B1 Esfera Incubada com Bactérias, Intacta; B2, B3 e B4 idem B1.	80
Figura 4.20	Eletromicrografias de Esferas Submetidas à Liofilização, Após o Congelamento em Nitrogênio Líquido. A1 - Esfera com Células de <i>B. pumilus</i> , Seccionada; A2, A3 e A4 idem A1.	81
Figura 7.1	Perfil Cromatográfico do n-Hexadecano: Amostra Controle no Tempo Zero	97
Figura 7.2	Perfil Cromatográfico do n-Hexadecano: Amostra Teste Após 48 Horas de Experimento com Células Livres	97
Figura 7.3	Perfil Cromatográfico do n-Hexadecano: Amostra Teste Após 96 Horas de Experimento com Células Livres	98
Figura 7.4	Perfil Cromatográfico do n-Hexadecano: Amostra Teste Após 144 Horas de Experimento com Células Livres	98

Figura 7.5	Perfil Cromatográfico do n-Hexadecano: Amostra Teste Após 48 Horas de Experimento com Células Imobilizadas (<i>Beads</i>)	99
Figura 7.6	Perfil Cromatográfico do n-Hexadecano: Amostra Teste Após 96 Horas de Experimento com Células Imobilizadas (<i>Beads</i>)	99
Figura 7.7	Perfil Cromatográfico do n-Hexadecano: Amostra Teste Após 144 Horas de Experimento com Células Imobilizadas (<i>Beads</i>)	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Composição Química do Óleo Cru (Adaptado de HYNE, 1995).	7
Tabela 2.2	Percentual em Média dos Hidrocarbonetos Presentes no Óleo Cru (Adaptado de HYNE, 1995).	7
Tabela 2.3	Características Necessárias ao Suporte para Imobilização de Enzimas e Células (KENNEDY & CABRAL, 1987).	24
Tabela 2.4	Comparação das Características dos Diferentes Métodos de Imobilização Adaptado de KENNEDY & CABRAL, 1987; BAILEY & ALLIS, 1986.	28
Tabela 2.5	Vantagens e Limitações do Uso de Microrganismos Encapsulados para Aplicações em Solo (CASSIDY et al., 1996).	29
Tabela 2.6	Exemplos de Suportes, Microrganismos e Aplicações em Biodegradação (CASSIDY et al., 1996).	29
Tabela 3.1	Características do n-Hexadecano Utilizado como Fonte de Carbono	35
Tabela 3.2	Composição do Meio Mineral de Büshnell-Haas – BH (ATLAS, 1995c).	35
Tabela 3.3	Composição do Meio Agar Soja Triptona (ATLAS, 1995c).	36
Tabela 3.4	Parâmetros Físico-Químicos da Quitosana Estudada.	41
Tabela 3.5	Concentração de Minerais do Meio Agar Quitosana-Mineral	42
Tabela 3.6	Condições Operacionais do Sistema GC-MS	47
Tabela 4.1	Caracterização Macroscópica e Microscópica das Linhagens Seleccionadas, Provas Bioquímicas Testadas e o Efeito dos Fatores Físicos no Crescimento Celular.	54
Tabela 4.2	Sensibilidade das Bactérias <i>B. pumilus</i> e <i>O. anthropi</i> a Diversos Antibióticos	58
Tabela 4.3	Influência do Aumento da Concentração de n-Hexadecano Antes e Depois de Agitação em Vortex Durante 60 Segundos	62
Tabela 4.4	Percentual de Hidrofobicidade das Linhagens Bacterianas em Diferentes Concentrações de n-Hexadecano.	63
Tabela 4.5	Parâmetros Avaliados Durante a Biodegradação com Células Livres.	67

Tabela 4.6	Parâmetros Avaliados Durante a Biodegradação com Células Imobilizadas em Quitosana.	67
Tabela 4.7	Percentual de Biodegradação de n-Hexadecano por <i>B. pumilus</i> na Forma Livre e Imobilizada com 0, 48, 96 e 144 Horas.	6

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ABS** – Absorvância
- BH** – Büshneel-Haas
- BSA** – Albuma Sérica Bovina
- CMC** – Concentração Micelar Crítica
- CG** – Cromatografia Gasosa
- CG-MS** – Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometro de Massa
- CPQBA/UNICAMP** – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas-
Universidade Estadual de Campinas – São Paulo.
- E24** – Percentual de Emulsificação com 24 Horas
- GD** – Grau de Desacetilação
- H** - Percentual de Hidrofobicidade
- kDa** – Kilo Daltons
- LAMI** – Laboratório de Microbiologia e Imunologia
- MEOR** – Recuperação Melhorada do Petróleo
- MEV** – Microscopia Eletrônica de Varredura
- rDNA** – DNA Ribossomal
- pb** – Pares de Bases
- PADETEC** – Parque de Desenvolvimento Tecnológico
- TCA** – Ciclo do Ácido Tricaborsilíco
- TSA** – Agar Triptona Soja
- TSB** – Caldo Triptona Soja
- UFC** – Universidade Federal do Ceará
- UFC/mL** – Unidades Formadoras de Colônias por Millitro
- UFPEDA** – Universidade Federal de Pernambuco Departamento de Antibióticos
- UV** – Radiação Ultravioleta
- VM** – Teste Bioquímico de Vermelho de Metila
- VP** – Teste Voges-Proskauer

RESUMO

Petróleo ou petroderivados são introduzidos nos ecossistemas através de vazamentos em reservatórios ou por atividade antropogênica relacionada com a extração, produção transporte, armazenamento, processamento, manipulação e distribuição aos usuários finais. Em geral estes compostos são prejudiciais à saúde dos organismos, podendo provocar um sério desequilíbrio ambiental. Diante desse quadro há um crescente interesse em se desenvolver métodos mais eficazes para a remoção desses poluentes do ambiente. As técnicas de biorremediação oferecem novas possibilidades para acelerar a degradação de poluentes e a utilização de microrganismos imobilizados desponta como uma alternativa vantajosa para recuperar áreas impactadas por petróleo ou seus derivados, bem como melhorar a eficiência de bioprocessos com compostos altamente recalcitrantes. O n-Hexadecano é o componente majoritário do óleo Diesel e é considerado um composto-modelo para a biodegradação de hidrocarbonetos de cadeia longa. Com base no exposto, este trabalho objetivou avaliar a biodegradabilidade do n-Hexadecano por linhagens de bactérias depositadas na coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE. Especificamente, pretendeu-se selecionar linhagens com maior potencialidade para degradar n-Hexadecano, identificá-las e comparar a eficiência da biodegradação utilizando células livres e imobilizadas em quitosana, visando o desenvolvimento de um produto para a utilização em processos de biorremediação ou tratamento de efluentes contaminados com hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa. Inicialmente, foram testadas 41 linhagens de bactéria, sendo 40 provenientes da região portuária de Suape-PE, e uma linhagem isolada a partir de um frasco de n-Hexadecano contaminado. Com base nos estudos preliminares foram selecionadas duas linhagens com maior potencial para degradar n-Hexadecano, as quais foram identificadas como *Bacillus pumilus* (Gram-positiva) e *Ochrobactrum anthropi* (Gram-negativa). Estas duas linhagens foram submetidas a estudos de caracterização fisiológica, bioquímica e de resistência a antibióticos e a fatores físicos e químicos. As linhagens selecionadas cresceram melhor em concentrações de 1 a 5 % de n-Hexadecano, embora tenham sido capazes de crescer em até 15 % desse hidrocarboneto. Estas bactérias não demonstraram adesão à fase oleosa (1 a 20 %) e produziram emulsificação acima de 50 %, porém somente *B. pumilus* apresentou halos de hemólise, o que é indicativo da produção de biosurfactante. Nenhuma das linhagens selecionadas produziu quitosanase e apenas *B. pumilus* apresentou resistência a soluções de quitosana (GD 78%) de até 4 %, sendo eleita para ser imobilizada nesse suporte. Além disso, *B. pumilus* apresentou características desejáveis para aplicações ambientais, tais como: resistência a uma ampla faixa de pH (5-11), temperatura (16-50 °C), concentração de NaCl (> 10 %), irradiação UV (8 minutos) e sensibilidade a vários antibióticos. Os resultados, obtidos nos ensaios de biodegradação em 1 % de n-Hexadecano com células livres e imobilizadas de *B. pumilus*, mostraram uma degradação, em seis dias, de cerca de 98,4 % e 90,8 %, respectivamente. A organização ultraestrutural de *B. pumillus* imobilizado em quitosana foi visualizada por microscopia eletrônica de varredura. O conjunto desses resultados suporta a hipótese de que essa linhagem de *B. pumillus* é uma candidata em potencial para uso, seja na forma livre ou imobilizada em quitosana, para aplicações em biorremediação de ambientes poluídos por petroderivados.

ABSTRACT

Petroleum and its derivatives are introduced in ecosystems through leaking in reservoirs or by activities related with the extration, transportation, storage, processing, manipulation and disposal. In general these compounds are harmful to the health of the organisms, being able to cause serious environmental damages. In front of this problem there is an increasing interest in the development of more efficient methods for removal of these pollutants from the environment. The biorremediation techniques offers new possibilities to increase the degradation of pollutants and the use of immobilized microorganisms appears as an advantageous alternative to recover areas polluted by oily sources, as well as improving the efficiency of the biological process with highly recalcitrant compounds. n-Hexadecane is the major component of the Diesel oil and is frequently used by a model compound of biodegradation of long chain hydrocarbons. The aim of this work was to evaluate the biodegradation of the n-Hexadecane by bacterial strains of the collection of microorganisms of the Antibiotic Department of the UFPE. Specifically, it was intended to select strains with a higher potential to degrade n-Hexadecane, identify them and compare the efficiency of the biodegradation using free and chitosan immobilized cells, aiming the development of product for use in biorremediation of wastewater polluted with long chain aliphatic hydrocarbons. Initially, 41 bacterial strains were tested, being 40 from the vicinity of Suape port in Pernambuco, and one strain from a contaminated flask of n-Hexadecane. On the preliminary studies of two strains with the highest potential to degrade n-Hexadecane were selected, they were identified as *Bacillus pumilus* (Gram-positive) and *Ochrobactrum anthropi* (Gram-negative). These two strains were submitted to physiological studies, biochemistry characterization and resistance tests to the physical and chemical factors and antibiotics. The selected strains had better grown in concentrations of 1-5 % of n-Hexadecane, although they have been capable to grow in even 15 % of this hydrocarbon. These bacteria had not demonstrated adhesion to the oily phase (1-20 %) and they produced emulsification above of 50 %. However only *B. pumilus* presented hemolytic activity, that is indicative of the biosurfactant production. None of the selected strains produced chitosanase and only *B. pumilus* presented resistance to chitosan solutions (DG 78%) up to 4 %, being select to be immobilized in this support. Moreover, *B. pumilus* presented desirable characteristics for environmental applications, such as: resistance to wide pH range (5-11), temperature (16-50 °C), concentration of NaCl (10 %), irradiation UV (8 minutes) and sensitivity a lot of antibiotics. This results show a degradation with free and immobilized cells in chitosan of 98,4 % and 90,8 %, respectively. The ultraestrutural was evaluated by scanning electron microscopy. The set of results support the hypothesis that *B. pumilus* is a potential candidate for use in bioremediation of contaminated environmental with petroleum by free or chitosan immobilized cells.

1. INTRODUÇÃO

O petróleo e seus derivados impulsionam a economia mundial, através da produção de energia e da sua utilização na indústria petroquímica, contudo, o seu processamento, incluindo extração, refinamento, estocagem e transporte, representa um risco ambiental devido à ocorrência de vazamentos rotineiros, derramamentos acidentais ou intencionais (URURAHY et al., 1998b; SHIRAKAWA et al., 2001).

Os hidrocarbonetos, presentes no petróleo e em seus derivados ao serem introduzidos no ambiente, podem gerar um grande desequilíbrio ecológico, tendo em vista sua toxicidade e atividade carcinogênica (MOREIRA, 1999). As refinarias de petróleo geram uma grande quantidade de derivados indesejáveis, que impactam o meio ambiente e são os principais poluidores do solo e mananciais de água. As fontes desses produtos são provenientes principalmente do fundo dos tanques-reservatórios e das unidades de tratamento. Nos Estados Unidos, por exemplo, existem 2 milhões de tanques subterrâneos para a armazenagem de gasolina e 90.000 deles oferecem riscos (ROSATO, 1998).

Estatísticas mostram que, no Brasil, as atividades como: carga e descarga de petróleo e/ou derivados, operações de lavagem de tanques de navios, tratamentos de óleo e outros, contribuem com 90% da poluição por hidrocarbonetos de petróleo. Derramamentos acidentais com transporte contribuem com apenas 5 a 10% da poluição, porém, sua ocorrência é muito mais danosa ao ambiente, caso não seja controlada rapidamente (VITAL, 1992; URURAHY, 1998; URURAHY et al., 1998a).

Devido aos altos custos energéticos envolvidos no processo de incineração de resíduos, além do risco potencial de poluição do ar e da ameaça de persistência de hidrocarbonetos, assim como da inadequação da disposição de resíduo tão tóxico em aterros sanitários, várias pesquisas são realizadas no sentido de desenvolver bioprocessos para o tratamento destes resíduos (URURAHY et al., 1998b).

Microrganismos imobilizados têm sido usados para recuperar áreas com derramamento de petróleo, na tentativa de obter formulações oleofílicas que mantenham os microrganismos e/ou os nutrientes na interface óleo-água, onde a biodegradação ocorre efetivamente, como também para melhorar a eficiência de bioprocessos com compostos altamente tóxicos (JIANLONG & YI, 1999; OH et al., 2000).

A imobilização em quitosana têm sido recentemente utilizada em aplicações ambientais, sendo vantajosa por seu baixo custo e retirar das zonas costeiras uma grande fonte

de poluição, a quitina, que deriva do exoesqueleto de insetos, caranguejos e camarões. A quitosana apresenta muitas características favoráveis à sua aplicação ambiental, tais como: biodegradabilidade, o fato de reagir prontamente com substâncias carregadas negativamente (podendo ser utilizada na remoção de sólidos suspensos) e absorver metais pesados (CHENG et al., 2002; CHUNG et al., 2005).

Os alcanos são os maiores componentes do petróleo, comumente encontrados em ambientes contaminados com este produto (MING SO & YOUNG, 1999a,b). O n-Hexadecano ($C_{16}H_{34}$) é um composto modelo, que representa os hidrocarbonetos alifáticos presentes no óleo cru, e é o componente majoritário do óleo Diesel. O Hexadecano pode ser encontrado em rios, como um resultado de atividades rotineiras com derivados de petróleo em refinarias, liberado dos tanques de estocagem ou até mesmo liberado por derramamento acidental (CHÉNIER et al., 2003). Desta forma, estudos visando à seleção de microrganismos com capacidade de degradar alcanos de cadeia longa são de fundamental importância para otimizar os processos de biorremediação.

2. OBJETIVOS

Diante do que foi exposto o objetivo geral deste trabalho foi investigar a biodegradabilidade de n-Hexadecano por bactérias, selecionando aquela de maior potencial para ser utilizada em biorremediação de ambientes impactados com petroderivados na sua forma livre ou imobilizada em quitosana. Dentro deste objetivo principal, os objetivos específicos foram:

- Selecionar dentre quarenta e um bactérias, as com potencialidade para degradar n-Hexadecano, e identificá-las;
- Realizar a caracterização macroscópica, microscópica, fisiológica, bioquímica e de sensibilidade a antibióticos das linhagens selecionadas.
- Avaliar o crescimento das linhagens selecionadas em glicose, como fonte de carbono;
- Analisar o crescimento celular em concentrações variadas de n-Hexadecano;
- Verificar a susceptibilidade das cepas selecionadas à imobilização em quitosana, através dos ensaios de resistência a quitosana e de produção de quitosanase;
- Realizar ensaios de biodegradação com a linhagem promissora em sua forma livre e imobilizada em quitosana, acompanhando o pH, o crescimento celular, percentual residual de n-Hexadecano, a produção de carboidratos, proteínas e atividade emulsificante, a fim de comparar o percentual de biodegradação, entre os experimentos;
- Investigar, por análises de microscopia eletrônica de varredura, como ocorreu o aprisionamento da bactéria no gel de quitosana.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Petróleo e seus Derivados

Os hidrocarbonetos do petróleo continuam sendo utilizados como a principal fonte de energia do planeta (RAHMAN et al., 2002). O petróleo é uma mistura complexa de muitos compostos como alcanos (parafinas), aromáticos, resinas (naftênicos ou cicloparafinas) e asfaltenos (asfálticos), que potencialmente podem ser eliminados por degradação microbiana. A composição química média do óleo cru e a faixa média das classes de moléculas de hidrocarbonetos presentes no óleo cru podem ser visualizadas nas Tabelas 2.1 e 2.2, respectivamente.

Tabela 2.1 – Composição química do óleo cru (Adaptado de HYNE, 1995)

Composição	Óleo cru (%)
Carbono	82-87%
Hidrogênio	12-15%
Enxofre	0.1-5,5%
Nitrogênio	0.1-1.5%
Oxigênio	0.1-4.5%

Tabela 2.2 – Percentual dos hidrocarbonetos presentes no óleo cru (Adaptado de HYNE, 1995)

Hidrocarbonetos	Peso (%)	Faixa de Percentagem
Parafinas	30	15 a 60
Naftênicos	49	30 a 60
Aromáticos	15	3 a 30
Asfáticos	6	restante

O n-Hexadecano é um constituinte parafínico que pode ser encontrado em grandes quantidades em óleos, como o óleo Diesel e óleos lubrificantes de carros (BARATHI & VASUDEVAN, 2001; CHÉNIER et al., 2003).

2.2 – Biorremediação

A biorremediação é uma das estratégias ecologicamente viável para a limpeza de áreas onde houve derramamento de petróleo e/ou de seus derivados. Esta tecnologia utiliza microrganismos para degradar poluentes ambientais e pode ser definida como uma reação

catalisada biologicamente, que transforma compostos quimicamente complexos em compostos mais simples. No caso de compostos orgânicos, pode ocorrer a conversão dos constituintes do composto original em produtos inorgânicos, processo esse denominado de mineralização (ALEXANDER, 1999a).

O objetivo da biorremediação é explorar os processos degradativos que ocorrem naturalmente para limpar os locais poluídos. Existe a biorremediação *in situ*, em que o tratamento é realizado no próprio local poluído, e a biorremediação *ex situ*, em que ocorre a remoção física do material contaminado para outra área a fim de tratá-lo (MAIER, 2000).

O princípio de todos os processos de biorremediação é propiciar um aumento na biodegradação por diferentes estratégias. A mais simples delas é a bioestimulação, que consiste na adição de nitrogênio e fósforo (ALEXANDER, 1999a,b; BAKER & HERSON, 1994; ROSATO, 1998).

Algumas estratégias consideram que o aumento da superfície oleosa tornará maior o acesso ao ataque microbiano e outras que supõem que a combinação de microrganismos ou nutrientes num dispersante estimulará a biodegradação.

As estratégias denominadas de bioaumento ou bioenriquecimento, adicionam microrganismos exógenos com capacidade degradadora, isolados naturalmente ou manipulados geneticamente, ou apenas seu DNA purificado.

A adição de surfactantes para aumentar a solubilidade aparente dos contaminantes e estimular a degradação anaeróbica pela adição de aceptores finais de elétrons (ROSATO, 1998; MAIER, 2000), também é considerada uma estratégia de favorecimento da biodegradação.

2.3- Biodegradação de Hidrocarbonetos

A habilidade dos microrganismos em degradar hidrocarbonetos foi primeiro evidenciada em 1895 por Miyoshi Apud MULLER-HURTIG et al., 1993. A biodegradação de substâncias orgânicas no ambiente é mediada geralmente por bactérias e fungos. As bactérias possuem características metabólicas que as colocam num grupo de microrganismos de reconhecida atividade degradadora, variabilidade genética, crescimento rápido e facilidade

para se aclimatar em diversos ambientes. Essas características são fundamentais na seleção de microrganismos para serem utilizados em processos de biorremediação.

Em geral, as bactérias Gram-negativas parecem ter uma mais alta tolerância a solventes do que as bactérias Gram-positivas. Esta diferença de tolerância pode ser devido à presença da membrana externa nas Gram-negativas, que contém polissacarídeos, os quais protegem contra os compostos hidrofóbicos (RODRIGUEZ et al., 2001)

O crescimento de microrganismos em hidrocarbonetos apresenta um problema particular, porque estes substratos são imiscíveis ou pouco solúveis em água. Muitas bactérias são capazes de emulsificar hidrocarbonetos em solução pela produção de agentes ativos de superfície, chamados de biosurfactantes, o quais favorecem a adesão das células ao substrato (MULLIGAN, 2005).

A otimização de parâmetros como: pH, nutrientes, oxigênio e temperatura favorecem um melhor desempenho dos microrganismos na biodegradação. A máxima eficiência nesse processo de biodegradação conduzirá a total mineralização do poluente com a produção de CO₂ e água (FRANKENBERGER JR., 1992; ATLAS & BARTHA, 1972).

Acredita-se que a membrana celular é o maior sítio de acúmulo de poluentes em microrganismos. Uma consequência desta exposição aos hidrocarbonetos é o aumento da permeabilidade celular, devido á sua toxicidade não específica, que é baseada na dissolução destes poluentes nas camadas lipofílicas da membrana celular, o que causa o rompimento da integridade celular (MAIER, 2000).

2.4 – Microrganismos Degradadores de Hidrocarbonetos

A capacidade em degradar hidrocarbonetos do petróleo é apresentada por diversos gêneros microbianos, principalmente bactérias e fungos. Estes microrganismos podem ser encontrados em ambientes marinhos, de água doce e no solo. Os organismos isoladamente podem metabolizar somente um número limitado de hidrocarbonetos, de forma que é necessária uma mistura de populações, com capacidade enzimática ampliada, para a degradação de misturas complexas de hidrocarbonetos no petróleo existente em amostras ambientais.

Os gêneros microbianos mais comuns de degradadores de hidrocarbonetos em ambientes aquáticos são, principalmente bactérias e leveduras dos gêneros: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Candida*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces*. Os fungos parecem ser mais importantes na biodegradação que ocorre em amostras de solo. Em geral, as bactérias e leveduras apresentam capacidade decrescente de degradação de acordo com o aumento da cadeia de carbono, ao passo que os fungos filamentosos não exibem degradação preferencial quanto ao tamanho (ROSATO, 1998).

Segundo a literatura, os gêneros mais importantes de bactérias, tanto de ambiente terrestre como marinho, são: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* e *Pseudomonas spp.* e os Corineiformes. Entre os fungos, *Aureobasidium*, *Candida*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces spp.* são os isolados mais freqüentes em ambiente marinho e *Trichoderma* e *Mortierella spp.* , são os mais comuns em solo (ROSATO, 1998).

2.5 – Biodegradação de Hidrocarbonetos no Mar

Os derrames de petróleo ou de seus derivados, principalmente os que ocorrem no mar, causam danos consideráveis ao meio ambiente, gerando uma preocupação de natureza pública, que pressiona os órgãos governamentais a terem soluções rápidas e econômicas. Quando o óleo cru é derramado em ambientes aquáticos, os componentes mais leves volatilizam, os componentes mais solúveis se dissolvem e os componentes mais pesados se aglomeram e tendem a sedimentar no fundo do oceano, onde são utilizados por microrganismos anaeróbicos com produção de biogás (CH_4 e CO_2). Os dados experimentais em laboratório e em campo confirmam as mudanças químicas no óleo cru durante a degradação microbiana. Os alcanos de cadeia curta ($<C_{10}$) são perdidos por evaporação ou pela dissolução na água, são os primeiros compostos a serem atacados pelos microrganismos. Os alcanos com números de átomos de carbono entre C_{10} - C_{24} são rapidamente degradados por microrganismos (MÜLLER-HURTIG et al., 1993). As primeiras providências, tomadas para atenuar o efeito ambiental, são a coleta física do material por meio de adsorventes e escumadeiras superficiais, o uso de dispersantes, a queima do óleo *in situ* ou aplicação de

agentes que catalisem a fotooxidação. Dentre as novas estratégias, a biorremediação emerge como a menos agressiva e a mais adequada para a manutenção do equilíbrio ecológico (ROSATO, 1998).

Devido ao espalhamento lateral do óleo, a dificuldade de sua contenção na superfície da água e aos danos causados a biota marinha, maior atenção tem sido dada a remediação de ambientes aquáticos. Nestes ambientes, o petróleo provoca a morte de peixes, aves marinhas e outras formas de vida. O óleo derramado pode permanecer, por mais ou menos tempo, numa determinada área, dependendo da corrente marinha, da sua composição e de uma série de fatores, tais como: físicos (turbulência da água), químicos (fotodecomposição), e biológicos (biodegradação), o que determinará o seu destino no mar, o seu grau de toxicidade e o seu tempo de persistência (ATLAS, 1984).

As descargas no mar, apesar de serem quase sempre em maior quantidade do que em terra, são mais susceptíveis a biodegradação. Devido ao menor tempo de residência das águas dos mares, o óleo nessas áreas tem mais facilidade de ser biodegradado do que em áreas próximas a estuários, onde o tempo de residência das águas é bem maior, causando maiores danos à biota local. O tempo de residência da água está diretamente relacionado ao aporte de minerais e de oxigênio que são fatores de elevada importância na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo (ATLAS, 1981a,b; ATLAS, 1984; ATLAS, 1981b; ATLAS, 1995a,b; ATLAS, 1995b).

2.6 - Biodegradação de Hidrocarbonetos no Solo

O biotratamento de solo é uma alternativa viável comparada aos métodos físico-químicos. Uma vez que a biodegradação ocorre naturalmente no solo, onde já existe microrganismos e a maior parte dos nutrientes, necessitando apenas de uma otimização da relação C:N:P para que ocorra satisfatoriamente o processo de biodegradação (GOMES, 2004). A degradação destes compostos no solo dependerá da concentração microbiana e de sua habilidade em degradar os compostos a que estão expostos.

Sabe-se que no solo, o óleo além de sofrer processo de fotodecomposição, pode percolar e atingir o lençol freático, sendo que a distribuição dos derivados líquidos de petróleo é pontual, com espalhamento lateral pouco extenso e de fácil controle (BARTHA, 1996). A

área atingida no solo é bem menor quando comparada à área de mesma quantidade de poluente derramado no mar ou mesmo em lagoas. Os principais problemas de contaminação em solo estão relacionados ao espalhamento vertical (percolação), devido ao constante risco de atingir o lençol freático (CORSEUIL et al., 1997). A natureza físico-química do solo e o tamanho de suas partículas influenciam diretamente na percolação e na degradação do poluente. Frações de argila e silte-argila, por exemplo, são mais susceptíveis à formação de complexos com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos que as frações de areia.

Entre os métodos utilizados para a eliminação dos resíduos produzidos por refinarias de petróleo, o *landfarming* é o preferido. Esse processo consiste na dispersão de conecções controladas de resíduos oleosos na camada superficial do solo e a biodegradação se dá por microrganismos nativos (ROSATO, 1998).

A fitorremediação, que é uma técnica que usa plantas para o tratamento *in situ* de solos contaminados, pode ser aplicada. É uma tecnologia emergente com potencialidade para efetuar uma limpeza efetiva e barata, permitindo a mineralização completa do poluente na rizosfera (PIRES et al., 2003).

2.7 – Respostas Fisiológicas e Comportamentais em Resposta a Hidrocarbonetos: Alterações nas Membranas Celulares.

Segundo Van Hamme et al. (2003), os hidrocarbonetos tendem a residir na área hidrofóbica, entre as monocamadas dos fosfolipídeos das membranas, e sua partição está relacionada ao coeficiente de partição água-octanol de compostos lipofílicos. A inserção de hidrocarbonetos altera a estrutura da membrana pela mudança de sua fluidez e conformação de suas proteínas, o que afeta as ligações da membrana e a transdução de energia.

Em termos de resposta geral a este tipo de estresse, as bactérias podem formar biofilmes, alterar a hidrofobicidade de sua superfície celular para regular a partição dos hidrocarbonetos na interface óleo-água. As bactérias Gram-negativas ganham uma proteção extra pelos seus componentes lipopolissacarídeos hidrofílicos que oferecem uma alta resistência à transferência de compostos lipofílicos.

Além disto mecanismos de reparo dependentes de energia podem ser usados para compensar as perdas ocorrentes nestas membranas resultantes dos compostos lipofílicos. Por exemplo, a fluidez da membrana pode decrescer pelo aumento de isomerizações em fosfolipídios ou pelo decréscimo de ácidos graxos insaturados. Estas mudanças podem estar associadas com o aumento do conteúdo de fosfolipídeos e com a biossíntese destes compostos em células estressadas por solventes.

As alterações nas membranas celulares servem para produzir uma barreira física de intercalação de hidrocarbonetos, pois em geral, acredita-se que os hidrocarbonetos interagem com os microrganismos de forma não específica e se movem passivamente para dentro das células. É claro que para os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos entrarem em contato com os seus substratos antes de qualquer transporte, tanto passivo, como ativo, são necessários alguns mecanismos. Segundo Müller-Hurtig et al. (1993), existem três mecanismos através dos quais ocorre a assimilação pelas células microbianas. Geralmente são considerados os seguintes: (1) interações das células com os hidrocarbonetos dissolvidos na fase aquosa, (2) contato direto das células com largas gotas de hidrocarbonetos e (3) interação das células com gotas de hidrocarbonetos solubilizadas/pseudosolubilizadas ou acomodadas, que são muito menores que as células.

O primeiro mecanismo é considerado válido mais para aromáticos solúveis em água e hidrocarbonetos gasosos. Geralmente está de acordo com as taxas de solubilização de alcanos de cadeia longa no meio aquoso. No segundo mecanismo, as células microbianas se ligam à superfície das gotas do óleo, que são muito maiores do que as células, e o substrato, presumivelmente, entra na célula via difusão ou transporte ativo. A disponibilidade da área de superfície do substrato para se ligar à célula é um fator limitante para o crescimento celular. No terceiro mecanismo, as células microbianas podem interagir com partículas diminutas de hidrocarbonetos solubilizados/pseudosolubilizados/microemulsificados, os quais são muito menores que as células. Estas estruturas formadas denominadas de micelas, ficam ligadas às células que atacam as gotas de hidrocarbonetos pelo segundo mecanismo. Dependendo do organismo, a introdução dos hidrocarbonetos na célula pode ser através de um mecanismo ou por uma combinação destes mecanismos citados.

Segundo Holden et al. (2002), os mecanismos relatados para o metabolismo bacteriano de hidrocarbonetos solúveis são: (1) a dissolução e difusão dos hidrocarbonetos dissolvidos às células que capturam estes hidrocarbonetos por via passiva ou transporte transmembrana; (2)

invaginação dos hidrocarbonetos de fase não aquosa dentro da célula; (3) produção bacteriana de biossurfactantes e emulsificantes que aumentam a pseudosolubilização local dos hidrocarbonetos favorecendo a transferência da fonte de carbono à bactéria degradadora.

Provavelmente, a melhor observação da evidência de que ocorre transporte ativo para n-alcenos é fornecida por Kim et al. (2002), onde esses pesquisadores estudando *Rhodococcus erythropolis* (S + 14He) verificaram que este microrganismo acumula preferencialmente n-Hexadecano, mesmo estando em uma mistura de hidrocarbonetos. A presença de inclusões de alcanos puros ou parcialmente oxidados pode ser um forte indicativo de que estes substratos podem ser acumulados contra um gradiente de concentração, presumivelmente um processo dependente de energia.

Alvarez (2003) estudando actinomicetos, observou que quando as células cresceram com n-Hexadecano, como única fonte de carbono, o ácido palmítico (C_{16:0}) foi o ácido graxo predominantemente acumulado e o seu percentual foi variou de 52 a 70% nas linhagens testadas. Além disto, este autor sugere ainda que os hidrocarbonetos não são usados somente para o crescimento destas bactérias, mas também para a biossíntese de triacilgliceróis, que são acumulados quando as células são cultivadas em condições limitantes de nitrogênio, sendo a β -oxidação e as vias de biossíntese *de novo* de ácidos graxos, as vias de produção destes compostos, independentemente destas células crescerem em condições balanceadas ou não. No entanto, a função destas rotas metabólicas parece depender da composição da fonte de carbono usada, pois durante o seu cultivo em n-alcenos, os principais ácidos graxos que ocorreram nas células estavam relacionados com o tamanho da cadeia carbônica original. Estes resultados sugerem que os alcanos são incorporados em lipídeos celulares, depois da oxidação monoterminar e sem a degradação completa a acetyl-CoA (Figura 2.1).

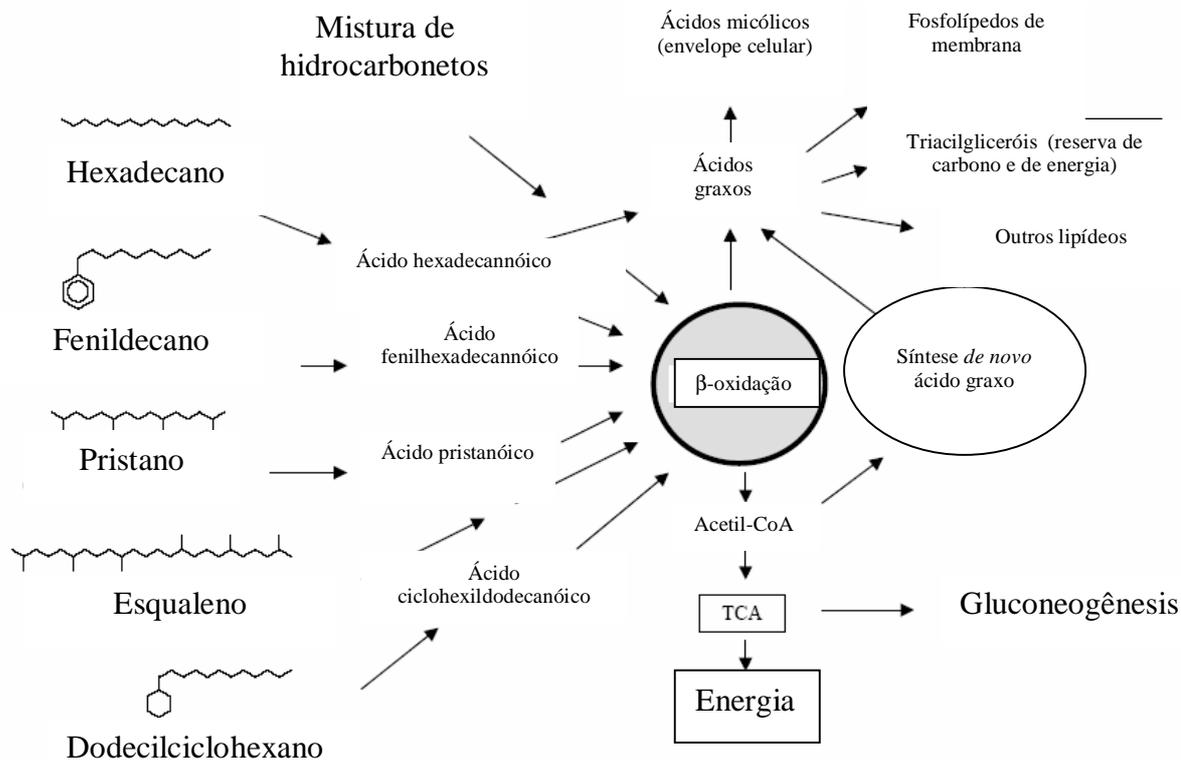


Figura 2.1: Degradação e assimilação de diferentes hidrocarbonetos por bactéria não-esporuladas (*Actinomycetes*). Sendo seu mecanismo adaptado em resposta à disponibilidade de hidrocarbonetos e com a produção de uma grande variedade de lipídeos com diferentes complexidades e funções (ALVAREZ, 2003).

2.8 – Biossurfactantes – Funções e Aplicações

Os biossurfactantes são um grupo heterogêneo de moléculas com atividade de superfície, produzidos por microrganismos. São moléculas anfipáticas, constituídas de uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica. A porção apolar frequentemente é uma cadeia hidrocarbônica, enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica (MULLIGAN, 2005).

Os biossurfactantes são classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana. As principais classes são: glicolipídeos, sintetizados por espécies dos gêneros de *Pseudomonas* e *Candida*, lipopeptídeos, sintetizados por *Bacillus* e outros gêneros,

fosfolípidos, sintetizados por *Thiobacillus thiooxidans* e complexos de polissacarídeos e lípidos, sintetizados por s diferentes espécies pertencentes ao gênero *Acinetobacter*.

O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde estes são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Outras aplicações incluem: a biorremediação e a dispersão no derramamento de óleos, a remoção e a mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem e a recuperação melhorada de petróleo.

Atualmente, as aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais, alguns biossurfactantes são conhecidos por possuir atividade terapêutica como: antibacteriano, antifúngico e antiviral. Em relação a sua produção nos países industrializados 70-75% dos surfactantes consumidos são de origem petroquímica, enquanto nos países em desenvolvimento os compostos de origem natural predominam (LANG, 2002; RON & ROSENBERG, 2001; NITSCHKE & PASTORE, 2002; MULLIGAN, 2005).

Nitschke & Pastore (2002) discutem em sua revisão, a função fisiológica dos biossurfactantes, bem como suas propriedades. Estes autores afirmam que embora a função fisiológica dos biossurfactantes ainda não tenha sido completamente elucidada, algumas funções têm sido atribuídas:

- Emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, facilitando o crescimento de microrganismos nestes substratos. Embora cepas de *Bacillus subtilis* produzem surfactantes somente em substratos hidrossolúveis;
- Transporte de hidrocarbonetos: funções atribuídas aos biossurfactantes de *Candida tropicalis*, onde um aumento significativo da porção lipídica de polissacarídeo de membrana foi detectado quando o microrganismo crescia em alcanos, indicando que o complexo polissacarídeo-ácido-graxo presente na superfície celular estaria envolvido no transporte de hidrocarbonetos;
- Aderência-liberação da célula a superfícies: uma das mais importantes estratégias de sobrevivência dos microrganismos é a sua habilidade em colonizar um nicho ecológico onde possa se multiplicar. O elemento chave nesta estratégia são estruturas de superfície celular responsáveis pela aderência das células às superfícies. Os microrganismos podem usar surfactantes ligados a parede para regular as propriedades da superfície celular, visando aderir ou se desligar de um determinado local, de acordo

com sua necessidade para encontrar novos habitats com maior disponibilidade de nutrientes, ou livrando-se de ambientes desfavoráveis;

- Atividade antibiótica demonstrada por vários biossurfactantes, principalmente os da classe dos lipopeptídeos e glicopeptídeos. Os ramnolipídeos de *P. aeruginosa* e a surfactina de *B. subtilis* funcionam como antibióticos, solubilizando os principais componentes das membranas celulares microbianas. Os microrganismos adquirem maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes através da excreção desses biossurfactantes no meio;

Apesar da diversidade de composição química e propriedades, algumas características são comuns à maioria dos biossurfactantes. Muitas dessas características representam vantagens sobre os surfactantes sintéticos:

- Atividade superficial e interfacial: os biossurfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais (detergentes aniônicos sulfatados), porque produzem menor tensão superficial em concentrações menores de biossurfactantes. A concentração micelar crítica (CMC) dos biossurfactantes que é uma medida de sua eficiência varia entre 1-2000mg/L, enquanto que a tensão interfacial (óleo/água) e superficial ficam em torno de 1 e 30mN/m, respectivamente;
- Tolerância à temperatura, pH e salinidade: alguns biossurfactantes apresentam estabilidade frente às variações térmicas e de pH podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas. O lipopeptídeo de *B. licheniformis* JF-2 é estável a temperaturas em torno de 75 °C por até 140 h e pH entre 5 e 12. Os biossurfactantes suportam concentrações de 10 % de NaCl, enquanto uma concentração salina de 2-3 % é suficiente para inativar surfactantes sintéticos;
- Biodegradabilidade: diferentes dos surfactantes químicos os biossurfactantes são facilmente degradáveis na água e no solo, o que os torna adequados para aplicações ambientais como a biorremediação de tratamento de resíduos;
- Baixa toxicidade: os biossurfactantes têm recebido maior atenção devido a crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos químicos artificiais, além disto, sua baixa toxicidade permite seu uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos.

Os biossurfactantes também apresentam a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e por possuírem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular. Além disto, possuem características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os torna comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência. Outra vantagem reside no fato de serem compostos que não derivam de petróleo, fator importante à medida que a produtividade dos poços do petróleo diminuem. A possibilidade de modificação da estrutura química e das propriedades físicas dos biossurfactantes, através de manipulações genéticas, biológicas ou químicas, permite o desenvolvimento de produtos para necessidades específicas.

2.9 – Aspectos Bioquímicos da Biodegradação Aeróbica de Hidrocarbonetos

As vias bioquímicas para a degradação de hidrocarbonetos dependem do substrato a ser metabolizado e do tipo de microrganismo envolvido.

Segundo Baker & Herson (1994), algumas generalizações podem ser feitas acerca do processo de biodegradação de hidrocarbonetos, como as que seguem:

1. Hidrocarbonetos alifáticos são geralmente mais fáceis de serem biodegradados do que os aromáticos;
2. Hidrocarbonetos alifáticos de cadeia normal são mais facilmente biodegradados do que os de cadeia ramificada. A presença de uma ramificação diminuirá sua degradabilidade;
3. Hidrocarbonetos saturados são mais susceptíveis à degradação do que os insaturados. A presença de insaturações dificulta a biodegradação;
4. Hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa são mais facilmente degradados do que os de cadeia curta. Hidrocarbonetos com menos de sete átomos de carbono são mais difíceis de serem degradados devido a sua toxicidade para os microrganismos.

Durante a degradação a atividade microbiana depende de muitos fatores relacionados com as propriedades físicas e químicas do poluente. Estes fatores incluem (MAIER, 2000):

- 1- O potencial genético ou a presença e expressão de genes degradadores apropriados apresentados pela comunidade microbiana nativa;
- 2- Biodisponibilidade ou efeito de solubilidade em água e a taxa de sorção do poluente, o qual é capturado pela célula;
- 3- Estrutura do hidrocarboneto, incluindo efeitos estéricos e eletrônicos. Efeitos estéricos ocorrem quando um grupo substituinte na molécula poluente impede, estericamente, o reconhecimento da molécula por uma enzima degradadora. Efeitos eletrônicos ocorrem quando grupos eletronicamente carregados, sejam grupos doadores ou retirantes de elétrons, modificam a densidade eletrônica do sítio reacional
- 4- Toxicidade ou efeito inibitório do poluente ao metabolismo celular.

2.9.1 – Vias Bioquímicas para a Biodegradação Aeróbica de Hidrocarbonetos

As vias catabólicas microbianas para a degradação de n-alcenos por uma variedade de fungos filamentosos, bactérias e leveduras têm sido bioquimicamente caracterizadas. Estas incluem as vias comuns de hidroxilação, como a via da oxidação terminal seguida pela ω oxidação e a menos comum, via da oxidação subterminal.

Na via da oxidação terminal, o passo de oxidação inicial é catalisado por uma monooxigenase que origina um álcool primário, que é também oxidado ao aldeído correspondente pela enzima álcool desidrogenases e depois ao ácido graxo correspondente por uma aldeído desidrogenases (Figura 2.2).

Na via subterminal, via encontrada em *Pseudomonas methanica*, o alceno é oxidado ao álcool secundário correspondente, por uma monooxigenase, depois a acetona e eventualmente a ácido graxo (Figura 2.3). Sistemas de dioxigenases também existem em alguns microrganismos, onde o n-alceno é oxidado inicialmente a hidroperóxido e então é transformado em álcool primário ou aldeído correspondente (WHITE *et al.*, 1998; MULLER-HURTIG *et al.*, 1993; BAKER & HERSON, 1994; MAIER, 2000).

Devido à sua similaridade estrutural com ácidos graxos e parafinas de plantas, que são ubíquos na natureza, muitos microrganismos podem utilizar alcanos de cadeia normal (n-alcanos), como única fonte de carbono e energia. Na realidade é fácil isolar microrganismos degradadores de alcanos de várias amostras ambientais, por serem usualmente considerados o tipo mais biodegradável de hidrocarboneto (MAIER, 2000).

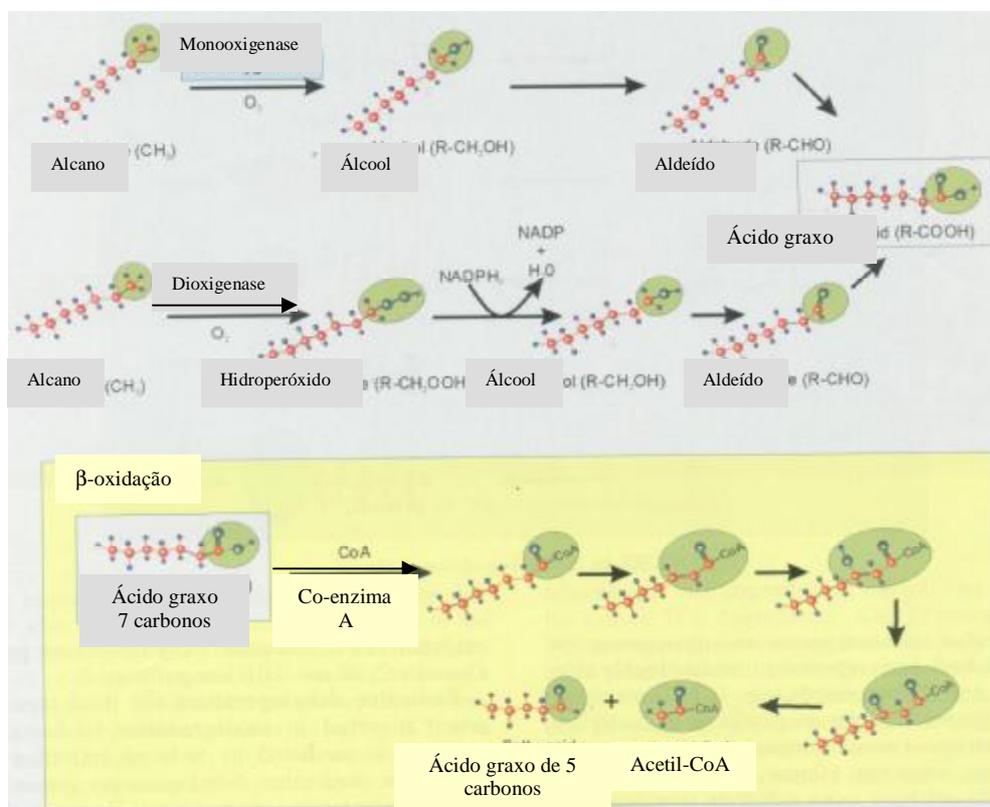


Figura 2.2 – Degradação de Alcanos : Ação da Monooxigenase e β -oxidação (MAIER, 2000).

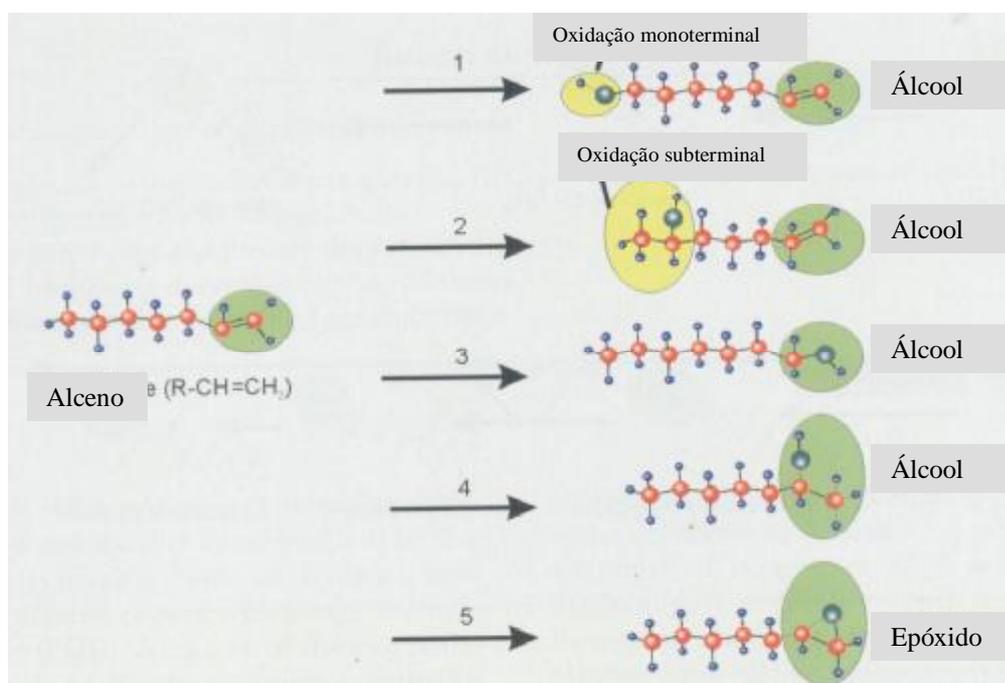


Figura 2.3 – Degradação de Alcenos- Oxidação Mono e Subterminal (MAIER, 2000).

2.10 - Fatores que Influenciam na Biodegradação

2.10.1 – Temperatura

A temperatura influencia na biodegradação no que se refere à natureza física e química do petróleo, bem como causa alteração na população microbiana (ATLAS, 1981a). A biodegradação de hidrocarbonetos pode ocorrer numa faixa de 0° C a 70° C. Em geral, à baixa temperatura, a viscosidade do óleo aumenta, a volatilização dos alcanos de cadeia curta, que são mais tóxicos, é reduzida, o que leva a um processo de biodegradação mais lento, devido à redução na atividade enzimática. Tipicamente o metabolismo dos hidrocarbonetos por microrganismos é máximo na faixa de temperatura de 30-40° C (ROSATO, 1998). A degradação de alcanos de cadeia longa, muitos dos quais são sólidos à temperatura menor que 10° C, é dificultada pela sua baixa biodisponibilidade (WHITE et al., 1998).

2.10.2 – Nutrientes

O petróleo é composto, principalmente de hidrocarbonetos, que podem servir como fonte de carbono para o desenvolvimento de microrganismos. Há, entretanto, a necessidade de outros nutrientes e, entre eles, o nitrogênio e o fósforo em maior quantidade, para que ocorra uma assimilação microbiana balanceada. Existe também a demanda de micronutrientes, tais como: ferro, enxofre, manganês, cálcio e sódio, porém estes já ocorrem em amostras ambientais.

2.10.3 – Oxigênio

O oxigênio é necessário ao processo de biodegradação aeróbica, uma vez que o catabolismo dos hidrocarbonetos envolve a oxidação inicial do substrato por oxigenases (ATLAS, 1984). Sendo sua principal importância a de funcionar como acceptor final de elétrons.

2.10.4 - Outros fatores

A biodegradação no ambiente terrestre sofre limitações, no que se refere à existência de água, para fins de solubilização. A atividade de água no solo pode variar de 0 a 0,99, valor este que difere consideravelmente do ambiente aquático.

Um outro fator a ser considerado no solo é a variação do pH, de 2,5 a 11,0 em diferentes solos. A maioria das bactérias e fungos apresenta um melhor desenvolvimento em pH neutro, podendo duplicar a taxa de biodegradação com a correção do pH do solo.

Alta salinidade também parece afetar negativamente a atividade microbiana, pois os sais interferem na atividade de água do meio, bem como modificam a pressão osmótica a que os microrganismos ficam expostos. Sabe-se que os fungos resistem mais a condições de alta salinidade do que as bactérias. Em ambientes costeiros, a biorremediação é bastante afetada pela alta concentração de sais (YANG et al., 1999; DEL'ARCO & FRANÇA. 2001).

2.11 - Aspectos Genéticos da Biodegradação

Segundo Barbieri (1998) os genes que codificam a informação gênica para a síntese de enzimas catabólicas estão, geralmente, presentes nos chamados plasmídeos degradadores. Os plasmídeos degradadores ocorrem naturalmente e variam em tamanho (de 15 a 500 kpb), podendo ser ou não transmissíveis. Essa mobilidade via conjugação ou transformação, pode levar a uma ampliação da capacidade metabólica do organismo, devido ao potencial de recombinação gênica. Os plasmídeos degradadores contêm genes envolvidos na biodegradação de compostos orgânicos, tais como: hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, como o bifenil, naftaleno, xileno e tolueno, produtos de seus metabolismos, como o benzoato e o salicilato, e hidrocarbonetos clorados, como o ácido 2,4-diclorofenóxidoacético. Esses plasmídeos podem conter genes que codificam parcialmente a via catabólica, como o naftaleno, ou totalmente como o tolueno. Quando um plasmídeo contém genes que codificam parcialmente a degradação de determinado composto, as outras enzimas necessárias para completar a via catabólica podem estar presentes em outros plasmídeos ou no cromossomo bacteriano. As enzimas codificadas pelos genes contidos nos plasmídeos degradadores são geralmente do tipo indutível.

O início da biodegradação geralmente segue um período de adaptação (aclimatação) dos microrganismos endógenos, que depende da estrutura molecular do poluente. Exposições prévias ao hidrocarboneto criam um ambiente no qual a via de biodegradação é mantida com uma comunidade aclimatada. A adaptação de uma população microbiana ocorre mais comumente pela indução de enzimas necessárias para a biodegradação, seguido por um aumento na concentração de microrganismos biodegradadores. A exposição prévia pode não implicar em uma maior biodegradação, e neste caso a degradação de certos poluentes requer um segundo tipo de adaptação que envolve um tratamento mutagênico, como uma mutação ou a transferência de um gene (MAIER, 2000).

2.12 – Imobilização de Células e Enzimas

A imobilização de células oferece um potencial promissor na melhoria da eficiência dos bioprocessos. Jianlong & Yi (1998) verificaram que os sistemas de tratamento de água,

que empregavam células imobilizadas, tinham um potencial em degradar compostos químicos tóxicos mais rapidamente, devido à alta densidade dos organismos especializados que são usados nestes sistemas. A expansão da biotecnologia e o desenvolvimento das pesquisas em genética têm estimulado a imobilização de enzimas e células (BICKERTAFF, 1997).

As vantagens das células imobilizadas sobre as células livres podem ser: a recuperação mais fácil de produtos e estes estando livres de contaminação com biomassa. Assim, os processos envolvendo células imobilizadas são mais eficientes na utilização do substrato e biomassa, podem ser usados em processos contínuos, com o uso de altas densidades de células. As desvantagens são os custos com a imobilização ou as limitações de transferência de massa criadas pelo suporte ou pela densidade celular.

Segundo Kennedy & Cabral (1987) não existe um suporte universal, porém diferentes características desejáveis devem estar presentes no material a ser utilizado para imobilização (Tabela 2.3).

Tabela 2.3: Características necessárias ao suporte para imobilização de enzimas e células (KENNEDY & CABRAL (1987))

CARACTERÍSTICAS
Grande área superficial
Permeabilidade
Características hidrofílicas
Insolubilidade
Estabilidade térmica, mecânica e química
Alta rigidez
Forma e tamanho de partículas adequados
Resistência ao ataque microbiano
Regenerabilidade

2.13 – Métodos de Imobilização de Células e Enzimas

Segundo Bickerstaff (1997) e Woodward (1988) existem cinco métodos principais de imobilização de células e enzimas, são eles: adsorção, ligação covalente, ligação cruzada, encapsulamento e aprisionamento (Figura 2.4).



Figura 2.4: Principais métodos de imobilização. Adaptado de Bickerstaff (1997)

- **Adsorção:** a imobilização por adsorção é o método mais simples. Envolve interações de superfície reversíveis entre enzima/célula e o suporte do material. As forças envolvidas são, em sua maioria, eletrostáticas, Van der Waals, iônicas, interações por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas que podem ser significativas. Estas forças são muito fracas, mas suficientes para uma razoável ligação, devido ao grande número destas interações.

O procedimento consiste em misturar o componente biológico e o suporte com propriedades de adsorção, sob condições adequadas de pH, por um período de incubação, seguido pela coleta do material imobilizado e uma lavagem extensiva para remover os excessos (não-ligados) dos componentes biológicos. As vantagens desta técnica são: pouco ou nenhum dano às enzimas/células, simples, barata e rápida; nenhuma mudança química para o suporte ou às enzimas/células e, por último, é reversível e permite regeneração das células/enzimas livres. Por outro lado, as desvantagens desta técnica são: vazamento das enzimas/células a partir do suporte/contaminação do produto, ligação não-específica, sobrecarga do suporte e impedimentos estéricos pelo suporte.

- **Ligação covalente:** este método de imobilização envolve a formação de uma ligação covalente entre a enzima/célula e o material do suporte. A ligação é normalmente formada entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os grupos funcionais pertencentes aos resíduos de aminoácidos da superfície da enzima. O número de aminoácidos funcionais é suficiente para participar na formação da ligação covalente. Muitos fatores podem influenciar a seleção de um suporte particular e as pesquisas têm mostrado que a hidrofiliabilidade é o fator mais importante para manter a atividade da enzima. Conseqüentemente, polímeros polissacarídeos, muito hidrofílicos são suportes populares para a imobilização de enzimas, como por exemplo, celulose, dextrana, agarose e amido. Os resíduos de açúcar nestes polímeros contém grupos hidroxil que são grupos funcionais ideais para a ligação covalente. Outros suportes como a sílica e os poros de vidro também são usados, entretanto são menos hidrofílicos.
- **Ligação cruzada:** este tipo de imobilização é livre de suporte e envolve a ligação das células ou enzimas num complexo tridimensional que pode ser realizado por métodos químicos ou físicos. Métodos químicos normalmente envolvem a formação de ligações covalentes entre as células e um reagente bi ou multi funcional, como o glutaraldeído e o tolueno di-isocianato. No entanto a toxicidade dos reagentes usados é um fator limitante. A ligação cruzada de células pela floculação é feita por meio de agentes flocculantes como, as poliaminas, polietilenoaminas, sulfonatos de poliestireno e vários fosfatos têm sido usados. A ligação cruzada é raramente utilizada como o único método de imobilização devido suas propriedades mecânicas e sua baixa estabilidade.
- **Encapsulamento:** esta técnica pode ser realizada pelo envolvimento dos componentes biológicos em uma membrana semipermeável, sendo similar ao método de aprisionamento em que as enzimas/células estão livres na solução, mas restritas no espaço. Proteínas ou enzimas, que são moléculas grandes não podem sair da cápsula, mas substratos e produtos pequenos podem passar livremente através da membrana semipermeável. Muitos materiais podem ser usados para construir uma microcapsula variando de 10-100 µm em diâmetro, por exemplo, nylon e nitrato de celulose.

Os problemas associados com a difusão são graves e podem resultar na ruptura da membrana se os produtos da reação se acumularem rapidamente. Outro problema é que a enzima/célula imobilizada pode ter a densidade similar ao volume da solução com problemas conseqüentes na configuração da reação e baixa dinâmica. É também possível

o uso de células biológicas como cápsulas, como os eritrócitos. Uma desvantagem deste método é a co-imobilização.

O tipo de imobilização por aprisionamento de células, na qual as células microbianas ficam aprisionadas dentro de uma matriz polimérica, que possua poros suficientes para permitir a difusão do substrato para as células e o produto celular para fora das esferas, é uma das técnicas mais amplamente utilizada (JIANLONG & YI, 1998).

- **Aprisionamento:** este método se caracteriza por manter as moléculas de enzimas livres na solução, mas restritas numa estrutura de gel. A porosidade da matriz gelificante é controlada para avaliar se a estrutura é firme o bastante para evitar o vazamento de enzimas ou células, e ao mesmo tempo permitir o livre movimento de substrato e produto. Inevitavelmente o suporte agirá como uma barreira de transferência de massa e isto poderá ter sérias implicações para a cinética da reação. Existem diferentes métodos de aprisionamento: gelificação ionotrópica de macromoléculas com cátions multivalentes (ex. quitosana); gelificação induzida pela temperatura (ex: agarose, gelatina); polimerização orgânica por reação química e fotoquímica (ex: poliacrilamida) e precipitação de solventes imiscíveis (ex: poliestireno).

O aprisionamento de materiais químicos e biológicos em suportes de polímeros naturais é o interesse de uma variedade de aplicações científicas e industriais. Polímeros naturais usados como suporte na tecnologia de aprisionamento, tais como: alginato, carragenana, agarose, quitina e quitosana têm vantagens por serem biodegradáveis, biocompatíveis e por não serem tóxicos (ALSARRA et al., 2004).

As características importantes das diferentes técnicas de imobilização estão sumariamente descritas na Tabela 2.4. Em geral, os métodos de imobilização química tendem a reduzir a atividade, pois as ligações covalentes formadas, que resultam da imobilização, podem perturbar a estrutura terciária da enzima nativa. Por outro lado, as ligações covalentes resultantes promovem ligações fortes e estáveis à enzima e podem em alguns casos, reduzir a desativação enzimática, sendo úteis para alterar a especificidade enzimática (BAILEY & ALLIS, 1986). Os efeitos de difusão e transferência de massa decorrem da resistência difusional ao transporte de substratos da solução externa para os sítios catalíticos e da difusão dos produtos da reação de volta para o meio extra particular.

Tabela 2.4: Comparação das características dos diferentes métodos de imobilização. Adaptada de Kennedy (1987); Bailey & Allis. (1986)

Característica	Adsorção Física	Ligação Iônica	Ligação Covalente	Ligação Cruzada	Aprisionamento
Preparação	Fácil	Fácil	Difícil	Difícil/Interm	Difícil
Atividade enzimática	Baixa/Interm	Alta/Interm	Alta/Interm	Baixa/Moderada	Baixa/Alta
Especificidade ao substrato	Introcável	Introcável	Trocável	Trocável	Introcável
Força da ligação	Fraca/Moderada	Moderada/Interm	Forte	Forte/Moderada	Forte/Interm
Estabilidade	Baixa	Interm	Alta	Alta	Alta
Proteção ao ataque microbiano	Não	Não	Não	Alguma	Sim
Regeneração do suporte	Possível	Possível	Raro/Impossível	Impossível	Impossível
Aplicabilidade geral	Baixa	Moderada	Moderada	Baixa	Alta
Custo da imobilização	Baixa	Baixa	Alta	Mod/Interm	Baixa/Interm

2.14 – Uso de Células Aprisionadas em Aplicações Ambientais

A necessidade de se usar microrganismos e/ou nutrientes na forma imobilizada no meio ambiente se justifica por vários fatores listados na Tabela 2.5. Entretanto dois fatores se destacam dentre diversos autores: o fato de estar levando ao meio ambiente um “fator novo” seja microrganismo ou nutriente de forma mais segura, porque restringe sua relação com o meio ambiente como um todo, se relacionando somente com o sítio-alvo a ser atingido e o outro fator de ordem econômica é que não ocorrerão perdas ocasionadas pela diluição em ambientes aquáticos abertos e a possibilidade de fazer com que permaneçam na interface óleo/água, onde a biodegradação efetivamente ocorre (OH et al. 2000; CASSIDY et al., 1996; CHEVALIER & NOUE, 1985).

Na revisão feita por Cassidy et al. (1996) pode-se visualizar de forma geral, os usos de bactérias em aplicações ambientais e sua vasta utilização em processos de biorremediação. Para se estabelecer uma boa relação de custo/benefício este autor aponta as vantagens e desvantagens da aplicação direta de bactérias imobilizadas em solos, o que está resumido na Tabela 2.5. Observa-se que o uso de células aprisionadas para aplicações em solo fornece um maior número de vantagens do que células livres ou adicionadas a outros suportes como vermiculita ou carvão.

Tabela 2.5: Vantagens e Limitações do Uso de Microrganismos Encapsulados para Aplicações em Solo (CASSIDY et al., 1996)

Vantagens

1. Reduzida possibilidade da contaminação do inóculo durante a estocagem, transporte e aplicação;
2. Reduzida possibilidade de derrames durante a aplicação;
3. Pode ser produzido em grandes quantidades, estocado por longos períodos liofilizado e usado empregando equipamentos mecânicos;
4. *Beads* são biodegradáveis, não poluem e não são tóxicos;
5. Fornece proteção aos fatores ambientais bióticos e abióticos, aumentando a taxa de sobrevivência;
6. Aumento da atividade metabólica das células encapsuladas;
7. Liberação lenta de células com reduzido movimento pelo solo a partir do transporte induzido pelo fluxo da água;
8. Aumenta a estabilidade plasmidial

Desvantagens

1. Solubilidade de gases e solutos podem ser restritas;
2. Taxas reduzidas de consumo de oxigênio
3. Alterações morfológicas e metabólicas podem ter um efeito negativo;
4. Efeitos na atividade de água podem ser limitantes;
5. Células podem não ter colônias estáveis fora dos *beads*, portanto aplicações repetidas dos *beads* podem ser necessárias.

Mais recentemente Quek et al. (2005) e Oh et al. (2000) utilizaram poliuretano para imobilizar *Rhodococcus sp.* e *Yarrowia lipolytica*, respectivamente tendo como objetivo, degradar e/ou remover petroderivados. Paje et al. (1998) utilizaram *Rhodococcus* imobilizados em alginato de cálcio para degradar benzeno. Outro aromático de interesse é o 2,4 e 4-clorofenol estudado por Jianlong & Yi (1998) e Quan et al. (2004) respectivamente, os quais usaram bactérias imobilizadas para degradar tal composto. Outros suportes, como o poliestireno e o álcool de polivinila também foram utilizados para degradar amostras de pentano e solos contaminados, respectivamente (IONATA et al., 2005; CUNNINGHAM et al., 2004).

Na Tabela 2.6 pode-se visualizar alguns exemplos de aplicações ambientais de microrganismos encapsulados e seus respectivos suportes de imobilização.

Tabela 2.6: Exemplos de suportes, microrganismos e aplicações em biodegradação (CASSIDY et al., 1996)

Compostos degradados ou reações	Microrganismos	Suporte
Clorofenol	<i>Rhodococcus spp</i>	Poliuretano
Fenol	<i>Candida</i>	Alginato
HPAs	Cultura mista	Argila granular
ρ -Cresol	<i>Pseudomonas sp.</i>	Alginato

2.15 – Imobilização por Quitosana

A quitina é um polissacarídeo nitrogenado branco, duro, inelástico encontrado no exoesqueleto de insetos, caranguejos, camarões, nas estruturas internas de alguns invertebrados e na parede de fungos. Os resíduos deste polímero natural são a maior fonte de poluição de áreas costeiras. Quitina é o polissacarídeo acetilaminado natural mais abundante e é estimado ser produzido anualmente tal qual a celulose (DUTTA et al. 2002; SYNOWIECKI & AL-KHATEEB, 2003; OMUSABA et al., 2000 CHATELET et al., 2001; WU et al. 2001).

Quitina é um polissacarídeo como a celulose que apresenta resíduo de β -ligação 2-acet-amido-2-deoxi-D-glucose, exibindo propriedades diferentes da celulose, onde os grupos hidroxila no C2 são substituídos por grupos acetamida (-NH-CO-CH₃) na quitina (Figura 2.5). A quitosana é obtida a partir da N-desacetilação da quitina. Este polissacarídeo é copolimérico da ligação das unidades β (1 \rightarrow 4) N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina. O grau de acetilação representa a proporção de unidades de N-acetil-D-glucosamina com respeito ao número total de unidades. Isto permite distinguir a quitina da quitosana. No caso da quitosana, o grau de acetilação é inferior a 50%. Este valor determina também o limite de solubilidade do polímero em soluções ácidas diluídas ($2 < \text{pH} < 6$) (CHATELET et al., 2001).

Devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, hidrofiliabilidade, propriedades bioativas e antibacterianas, a quitosana pode ser usada até como biomaterial, ou como vesícula para a liberação controlada de drogas, pois possui grupamentos amino reativos que mostram aplicação em diferentes áreas: como um agente antimicrobiano, na agricultura, como um esclarecedor das respostas de defesas de plantas, como um agente flocculante em tratamento de águas residuárias, como um aditivo em indústrias alimentícias, como agente hidratante em cosméticos e mais recentemente como um agente farmacêutico em biomedicina. (RABEA et al. 2003; JAMEELA & JAYAKRISHNAN, 1995; THARANATHAN & KITTUR, 2003; SYNOWIECKI & ALI-KHATEEB, 2003).

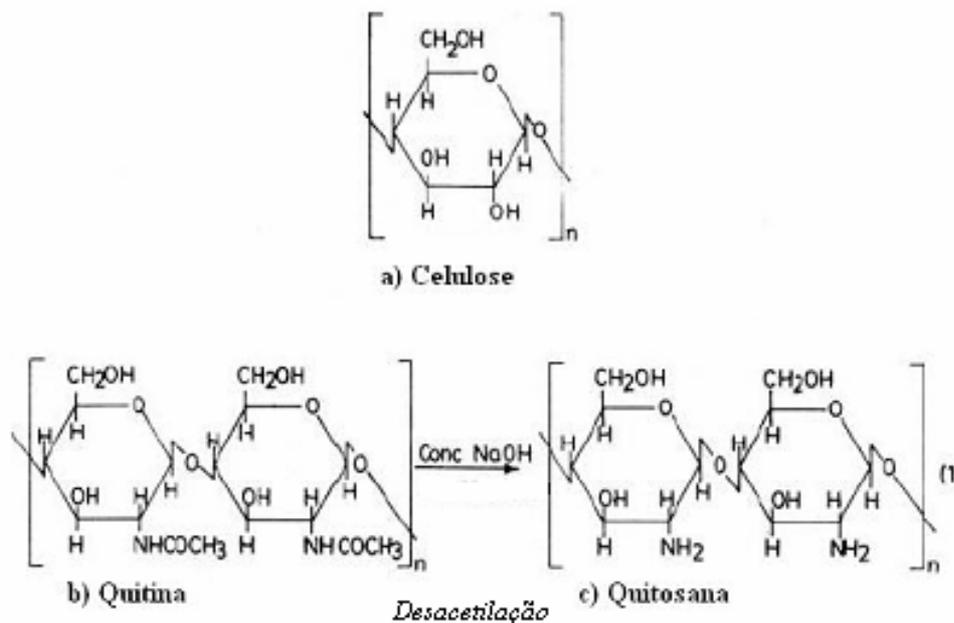


Figura 2.5: Estrutura Química da Celulose (a),Quitina,(b) e da Quitosana (c).

Diversas características da quitosna estimulam cada vez as mais pesquisas com este biopolímero em aplicações ambientais (GUIBAL et al. 2005; DUTTA et al. 2002).

A quitosana reage prontamente com substâncias carregadas negativamente como proteínas, polissacarídeos, ácidos graxos, vitaminas e sais minerais, além de absorver metais pesados, tais como: Cd (II), Cu (II),Cr (III), Pb (II), Zn (II) Ni (II), Hg (II), U (VI) e V (IV), a partir de resíduos industriais, devido à presença de grupamentos aminos livres (LEE, et al., 2005; LEE et al., 2001; BASSI & PRASHER, 2000, GUIBAL, 2004). Devido às suas propriedades de floculação e coagulação, a quitosana tem sido bastante usada para a remoção de sólidos suspensos, turbidez, sendo usada até para a separação seletiva de proteínas (GUO e et al., 2005). Pelo fato de ser mais economicamente atrativa, a quitosana se destaca dentre outros absorventes típicos, tais como o carbono ativado, para a remoção de compostos orgânicos e corantes de águas residuárias, bem como a remoção de poluentes de águas residuais da criação de peixes (CHEN et al., 2002; CHUNG et al., 2005),

No passado, a quitosana foi bastante utilizada em pulverizações para recobrir frutas frescas, a fim de aumentar sua vida útil de prateleira. Neste contexto a atividade antimicrobiana da quitosana *in vitro* e *in vivo*, bem como de seus derivados, contra diferentes grupos de microrganismos, como bactérias e fungos, também têm recebido uma considerável

atenção nos últimos anos. (QI et al., 2004; NO et al., 2002; TSAI et al., 2002; BADAWY et al., 2005; LIU et al., 2004; WANG et al., 2005; KOIDE, 1998)

A atividade antimicrobiana da quitosana provavelmente ocorre por sua atuação nas membranas celulares dos microrganismos, tal qual proposto por Liu et al. (2004), os quais estudaram o efeito de soluções de quitosana nas membranas celulares e concluíram que as soluções de quitosana aumentam a permeabilidade da membrana externa e da membrana interna, chegando a rompê-las, com a liberação dos conteúdos celulares. Este dano é provavelmente causado pelas interações eletrostáticas entre os grupamentos NH_3^+ , grupamentos acetato da quitosana e os fosfolipídeos das membranas celulares tanto de Gram-positivas quanto de Gram-negativas.

Zheng & Zhu (2003) averiguaram se a atividade antimicrobiana da quitosana poderia estar associada ao seu peso molecular, estes pesquisadores concluíram que a quitosana age de maneira diferenciada em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, quando se estabelece uma relação entre o seu peso molecular e o tipo de microrganismo envolvido. É notável que para microrganismos Gram-positivos, como o *Staphylococcus aureus* o aumento do peso molecular aumentaria o efeito antimicrobiano, provavelmente pela formação de um filme de quitosana que inibiria a adsorção de nutrientes e que para microrganismos Gram-negativos, como a *Escherichia coli*, o aumento da atividade antimicrobiana estaria relacionado justamente com a diminuição do seu peso, tendo em vista que quitosanas de baixo peso molecular entrariam mais facilmente nas células, causando distúrbios metabólicos.

Devido à sua propriedade antibacteriana a imobilização de microrganismos em seu interior, torna-se um pouco limitada, tendo em vista sua atuação bactericida nas membranas de Gram-positivos e Gram-negativos, além disto, este biopolímero pode funcionar como um agente quelante de metais traços, podendo interferir na produção de toxinas e no crescimento celular (RABEA et al., 2003).

SIEMANN & WAGNER (1993) estudando bactérias produtoras de biosurfactantes em diferentes suportes, apresentaram resultados desfavoráveis ao uso de suas linhagens bacterianas imobilizadas em quitosana à produção de biosurfactantes. Entretanto estes autores não estudaram o efeito da quitosana sobre suas linhagens, existindo a possibilidade de estas bactérias estarem mortas e por isto não terem produzido biosurfactantes.

Dentre as metodologias de aprisionamento de células em géis ionotrópicos, a imobilização em quitosana surgiu com diferenciais que favorecem seu estudo, tais como: o de

serem mais estáveis em soluções tampão de fosfato, possuem boas propriedades mecânicas e serem realizadas a temperatura ambiente (VORLOP & KLEIN, 1980). Além destes fatores a quitosana é um produto disponível comercialmente, e é solúvel em ácido orgânicos diluídos, como o ácido acético e ácido fórmico, mas é insolúvel em meios básicos, o que possibilita a protonação de seus grupamentos NH_2 , ocorrendo a formação dos *beads*.

Existem diversas metodologias de aprisionamento de enzimas e células utilizando quitosana, que podem ser visualizadas em Vorlop & Klein, 1980; Kaya & Picard, 1996; Chatelet et al., 2001; Lin et. al, 2005; Alsarra et al., 2004 dentre outros. Entretanto a metodologia utilizada neste trabalho foi especialmente desenvolvida para as condições da quitosana utilizada e do microrganismo imobilizado, respeitando suas interações.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Fonte de Carbono

A fonte de carbono utilizada neste trabalho foi o n-Hexadecano, cujas características estão expressas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Características do n-Hexadecano utilizado como fonte de carbono

CARACTERISTICAS	n-Hexadecano
Fabricante	VETEC
Percentual de Pureza	99%
Densidade a 20° C	0,773 / 0,774
Peso Molecular	226,45
Massa	1L ~ 0,77 Kg
Formula molecular	C ₁₆ H ₃₄

3.2 – Microrganismos

Foram utilizadas quarenta linhagens bacterianas, previamente isoladas de amostras poluídas por petroderivados, coletadas na Lagoa da Barra situada no Complexo Industrial Portuário de Suape-PE, e uma linhagem que foi isolada de um frasco de n-Hexadecano contaminado. Para o isolamento desta cepa, uma alíquota de 100 µL do hidrocarboneto foi gotejada sobre a superfície de uma placa contendo o meio de Büshnell-Haas sólido (agar 1,5%), *vide* Tabela 3.2 incubada a 30 °C durante uma semana.

Todos os isolados estão depositados na coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE.

Tabela 3.2 – Composição do meio mineral de Büshnell-Haas – BH (ATLAS, 1995c)

COMPONENTES		
K ₂ HPO ₄		1,00g
KH ₂ PO ₄		1,00g
NH ₄ NO ₃		1,00g
MgSO ₄ .7H ₂ O		0,20g
FeCl ₃ .2H ₂ O		0,05g
CaCl ₂ .2H ₂ O		0,02g
Água destilada		1L
Agar	Quando sólido	15,00g
	pH 7,0 ± 0,2	

3.3 - Manutenção das Linhagens Bacterianas

Os isolados bacterianos foram mantidos em tubos contendo meio de Agar Triptona Soja - TSA (Acumedia – Baltimore, USA) (Tabela 3.3) em camada alta, recobertos com óleo mineral estéril, e estocados sob refrigeração a temperatura na faixa de 4-8° C. Mensalmente essas culturas foram transferidas para meios novos. As culturas de trabalho foram mantidas em tubos com TSA inclinado.

Tabela 3.3 – Composição do meio de Agar Triptona Soja (ATLAS, 1995c)

COMPONENTES	
Tripticase	15,00g
Peptona de soja	5,00g
Agar	15,00g
Cloreto de sódio	5,0g
Água destilada	1L
pH 7,3 ± 0,2	
Agar	Quando sólido 15,00g

3.4– Seleção de Bactérias Degradadoras de n-Hexadecano

Esta seleção foi realizada levando-se em consideração o crescimento das quarenta linhagens bacterianas em frascos de Erlenmeyer de 250 ml, contendo 10 % de inóculo, 1% de n-Hexadecano ou 1% de glicose (controle), como única fonte de carbono em meio de Büshnell-Haas (Tabela 3.3), totalizando um volume final de 62,5 mL. Este experimento foi realizado em duplicata. Os frascos ficaram sob agitação de 160 rpm durante 72 horas a 25 °C. Amostras das culturas foram recolhidas para a leitura em espectrofotômetro (Genesys Mod. 10uv, USA) a 600 nm, nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas, para o acompanhamento do crescimento.

3.5 – Curva de Crescimento das Linhagens Seleccionadas

As curvas de crescimento das linhagens seleccionadas foram determinadas através de medidas de absorvância a 600 nm de culturas desenvolvidas em Caldo Soja Triptona (TSB – Acumedia – Baltimore, USA), cultivadas em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100

mL de meio de TSB, 10 mL de inóculo, preparado em caldo triptona soja TSB. Os frascos foram mantidos sob agitação de 250 rpm durante 20 horas a 25° C, sendo retiradas alíquotas a cada hora para a medição da absorvância. Estes experimentos foram realizados em triplicata.

3.6 – Identificação das Linhagens Bacterianas Selecionadas

Os isolados bacterianos selecionados foram submetidos à análise de suas características macroscópicas, microscópicas, bioquímicas, fisiológicas e de sensibilidade a antibióticos.

A caracterização macroscópica das colônias crescidas em TSA a 35 °C por 24 h foi realizada com o auxílio de um estereomicroscópio óptico SMZ acoplado a um sistema digital de captura de imagem (Nikon, Coolpix). Colônias isoladas foram usadas para a preparação de lâminas a fresco e de esfregaços, os quais foram corados pelos métodos de Gram (para coloração de parede celular) e Wirtz (para coloração de esporos), e observação em microscópio óptico com objetiva de imersão. A presença de esporos também foi verificada submetendo a cultura à temperatura de 80 °C durante 15 minutos, após este tempo foi estriada em placa com meio de TSA e incubada a 35 °C por 24 horas (RIBEIRO & SOARES, 1998).

Os isolados foram submetidos às provas bioquímicas de produção de Indol, Vermelho de Metila, Voges Proskauer, produção de H₂S, motilidade, utilização de citrato, hidrólise de amido, gelatina e quitosana, realizadas segundo o Manual de Bergey para a Determinação Bacteriológica (HOLT et al., 1994).

A influência dos fatores físicos (temperatura, pH, pressão osmótica e radiação) foi investigada, tendo em vista a possível aplicação ambiental das bactérias selecionadas, portanto sendo assim importante averiguar a influência destes fatores sobre esses microrganismos.

Para testar o efeito da pressão osmótica, inoculou-se 0,5 mL das culturas crescidas em TSB a 35 °C por 24 horas (absorvância $0,200 \pm 0.020$) em tubos contendo 4,5 mL de TSB com as seguintes concentrações de NaCl: 0, 2, 5, 7 e 10% (w/v). Após incubação a 35 °C por 24 horas foram feitas medidas de absorvância a 600 nm.

Testou-se a influência da temperatura, inoculando-se 0,5 mL das culturas crescidas em TSB a 35° C por 24 horas (absorvância $0,200 \pm 0.020$), em tubos contendo 4,5 mL de TSB e

submetendo-os as temperaturas de 18, 25, 35, 40, 45, 50, a 55 °C em estufa, verificando-se o crescimento após 24 h através de medidas de absorvância a 600 nm.

Para verificar o efeito da radiação ultravioleta as culturas, crescidas em TSB a 35 °C por 24 horas e densidades ajustadas a $0,200 \pm 0,020$, foram semeadas com o auxílio de *swab* esterilizado sobre a superfície de placas de Petri contendo meio de TSA. Em seguida, as placas foram abertas e irradiadas com ultravioleta a 260 nm durante 10 min, dentro da câmara de fluxo laminar. Após a irradiação, as placas foram incubadas em estufa a 35 °C por 24 horas e observadas quanto ao crescimento.

Testou-se a influência do pH, inoculando-se 0,5 mL das culturas crescidas em TSB a 35° C por 24 horas (absorvância $0,200 \pm 0.020$), em tubos contendo 4,5 mL de TSB, com pHs variando de 3 ao 14, verificando-se o crescimento após 24 h a 35 °C, através de medidas de absorvância a 600 nm.

A sensibilidade das bactérias a antibióticos foi avaliada através de antibiogramas realizados de acordo com o método de Bauer et al. (1966). Para tanto, as culturas foram inicialmente crescidas em meio de TSB a 35 °C por 24 horas, ajustadas suas absorvâncias a $0,200 \pm 0,020$ (10^7 – 10^8 UFC/mL) e inoculadas em placas de Petri contendo meio de ágar Müller Hinton (Merck, USA) com o auxílio de *swab*. Em seguida, foram colocados discos de antibióticos comerciais (Cecon, São Paulo, Brasil) com o auxílio de uma pinça esterilizada. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h quando então foram medidos os diâmetros dos halos de inibição ao redor dos discos. Foram testados os seguintes antibióticos: Ampicilina (10µg), Canamicina (30µg), Ciprofloxacina (5µg), Clindamicina (2µg), Cloranfenicol (30µg), Eritromicina (15µg), Gentamicina (120µg), Nitrofurantoína (300µg), Norfloxacin (10µg), Oxacilina (1µg), Penicilina (10µg), Rifampicina (5µg), Sulfazotrim (25µg), Tetraciclina (30µg), Tobramicina (10µg) e Vancomicina (30µg). Os ensaios foram feitos em duplicata e os resultados expressam a média de três experimentos independentes.

As linhagens selecionadas neste trabalho foram identificadas a nível de espécie através dos perfis de ácidos graxos determinados por cromatografia gasosa (CG), no Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, sob a responsabilidade do Prof. Marcos Rogério Totola. Quando não foi possível a identificação por esta metodologia foi realizada a identificação molecular da linhagem promissora utilizando o seqüenciamento e análise filogenética de fragmentos de gene de RNAr 16S, no Centro Pluridisciplinar de

Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas, sob a supervisão da professora Valéria Maia de Oliveira.

3.7 – Crescimento das Linhagens Seleccionadas em Diferentes Concentrações de n-Hexadecano

Para este ensaio, as linhagens bacterianas foram inicialmente crescidas em TSA a temperatura de 35 °C durante 48 horas, após este tempo três alçadas foram inoculadas em 50mL de TSB, em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, mantidos sob agitação de 160 rpm, à temperatura ambiente, durante sete horas (fase exponencial). As culturas foram centrifugadas a 10.000 g (Jouan GR2022, França) durante 20 minutos a 4 °C, sob condições assépticas. Os precipitados foram submetidos a duas lavagens com solução de NaCl 0,9% esterilizada, sob centrifugação a 10.000 g por 10 min. Ao final, os precipitados foram recuperados em 20 mL de meio BH e uma alíquota de 0,5 mL desta suspensão microbiana foi inoculada em tubos rosqueados contendo n-Hexadecano nas concentrações de 1%, 5%, 10% e 15%, e levados a um volume total de 5 mL com meio de BH. Estes tubos foram mantidos estáticos à temperatura ambiente e nos tempos 0, 24, 48, 96, 144 e 168 horas, dois tubos foram retirados para as medidas de absorvância e testes de emulsificação.

3.8 – Ensaio de Adesão Bacteriana a Hidrocarbonetos

O ensaio de adesão a hidrocarbonetos foi realizado de acordo com o método descrito por Kim et al. (2002) para as linhagens seleccionadas.

A partir de culturas em fase exponencial de crescimento em TSB ajustou-se um inóculo com absorvância em torno de $0,200 \pm 0,020$, que foram inoculados em tubos rosqueados contendo TSB, na proporção de 10% (v/v), e mantidos sob agitação de 160 rpm durante 24 h à temperatura ambiente (25 °C). Após este período, a absorvância das culturas foi mensurada a 600 nm. Em seguida, adicionaram-se volumes de n-Hexadecano de forma a obter concentrações finais de 1, 2, 5, 10 e 20% deste composto. Logo após adicionar o hidrocarboneto, os tubos foram agitados durante dois minutos, depois foram deixados em

repouso por 15 minutos e finalmente mensurou-se novamente a absorvância, com cuidado para não retirar alíquotas da fase oleosa. A diferença obtida entre as absorvâncias da fase aquosa antes e depois de se misturar com o n-Hexadecano foi usada para expressar a hidrofobicidade (H) das células, expressa em percentual, ou seja:

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

3.9 – Caracterização da Quitosana em Flocos

A quitosana utilizada neste trabalho foi extraída de cascas de camarão e foi fornecida pelo Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC) da UFC (Universidade Federal do Ceará). A Tabela 3.4 mostra os parâmetros físico-químicos da quitosana empregada e a seguir estão descritas as suas especificações e características organolépticas:

- Especificações

Nome comum: Quitosana.

Natureza química: Polímero linear combinado por ligações β -(1-4)- glicosídica.

Nome químico: Poli-2-deoxi-2-amino-glucose.

Fórmula química: $(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N})_n$.

Peso molecular: Monômero (161 D); Polímero (60.000 – 300.000 D).

Método de fabricação: Produto obtido pela desacetilação da quitina.

- Características Organolépticas

Não existe nenhum teste padrão para se avaliar a cor padrão de quitosana, porém muitas soluções de quitosana exibem uma coloração amarelada ou incolor. Já a quitosana em pó ou em flocos deve apresentar as seguintes características organolépticas:

Cor: branca a creme

Odor: característico

Aspecto: flocos

Na Tabela 3.4 pode-se visualizar os parâmetros físico-químicos da quitosana estudada.

Tabela 3.4 - Parâmetros físico-químicos da quitosana estudada

Teste	Resultado	Método
Aparência	De acordo	Visual
Perda por dessecação	12,5 %	3 horas a 105° C
Resíduo de Ignição	0,44 %	United States Pharmacopeia Vol. 23
Grau de desacetilação	78 %	Titulométrico
Peso molecular	117.000	Viscosimétrico (Viscosímetro de Ubbelonde)
Viscosidade	15 cps	Viscosimétrico [Viscosímetro de Brookfield – Modelo (DV-II+) – Marca (LV Spindle#1), a 25°C]
pH	8,8	Dispersar 1g de quitosana em 90 mL de água deionizada, agitar por 15 min. Medir o pH
Odor	De acordo	-
Identificação	De acordo	Infravermelho (I.R.)

3.10 – Avaliação do Efeito da Quitosana Sobre as Linhagens Seleccionadas

O efeito da quitosana sobre as linhagens de bactéria foi avaliado de acordo com a metodologia sugerida por Zheng & Zhu (2003). Inicialmente, culturas crescidas em TSA durante 24 horas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 9,0 mL de TSB e incubadas a 35 °C durante 12 horas. 100 µL dessas culturas foram transferidos para tubos contendo 1,0 mL de solução de quitosana nas concentrações de 1, 2, 3 e 4 %, previamente preparados em 1% de ácido acético e, também, foi usado 1,0 ml de TSB (controle negativo) e 1,0 mL de 1% de ácido acético (controle da solução de quitosana). Ao final de 1h e 24h foram realizados subcultivos em placas de Petri contendo meio de TSA e, após a incubação a 35°C por 24 h, essas placas foram analisadas visualmente para verificar o efeito da quitosana sobre o crescimento das bactérias.

3.11 – Pesquisa de Atividade Quitosanásica

A pesquisa de quitosanase foi realizada inoculando-se as linhagens bacterianas em meio de Agar Quitosana-Mineral e confirmada pela verificação de halos de hidrólise ao redor das colônias após a incubação a 30 °C por 24h. Uma linhagem controle, produtora de quitosanase, proveniente da Coleção do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Ciências Biológicas da UFC foi utilizada para se averiguar a eficiência das placas de quitosana. Para este ensaio as linhagens de bactéria foram previamente crescidas em

placas com TSA durante 24 horas a 35 °C e então transferidas para tubos de TSB, ficando neste meio por 12h a 35 °C. 100 µL das culturas foram inoculados em placas de Agar Quitosana 0,1 %, preparado em uma solução de sais minerais, conforme descrição a seguir:

I) Solução de Quitosana

- 1 g de quitosana em flocos (Grau de Desacetilação 78 %) foi dissolvido em 200 mL de uma solução de ácido acético a 1% e deixado sob agitação em agitador magnético por pelo menos 2h;

II) Solução de Minerais:

- Os minerais foram pesados nas quantidades abaixo (g/L) e dissolvidos em 500 mL de água destilada (Tabela 3.5).

Tabela 3.5: Concentração de Minerais do Meio Agar Quitosana-Mineral

Componentes	Concentração (g/L)
NaH ₂ PO ₄	1,30
KH ₂ PO ₄	3,00
NaCl	0,50
NH ₄ Cl	1,00
MgSO ₄	0,24
CaCl ₂	0,01
pH final ajustado para 6,5 com NaOH 1N	

III) Solução de Quitosana-Minerais

- A solução de quitosana (200 ml) foi misturada à solução de minerais (500 ml), homogeneizada e o pH foi ajustado para 6,5 com NaOH 1N. Esse meio foi esterilizado a 110 °C por 10 min;

IV) Solução de Agar a 2%

- Foi preparado 300 mL de Agar a 2% e autoclavado a 121 °C por 15 min

V) Agar-Quitosana a 0,1%

- A solução de Quitosana-minerais (700ml) foi misturada assepticamente à solução de Agar (300 ml) e distribuída em placas de Petri esterilizadas

3.12 – Preparação das Esferas (*Beads*) de Quitosana com a Linhagem Seleccionada Imobilizada

Uma cultura da linhagem seleccionada, preparada em meio de TSB, em fase exponencial de crescimento foi ajustada para uma absorvância de $1,00 \pm 0,020$ em espectrofotômetro a 600 nm. Essa cultura foi centrifugada a 10.000 g por 10 min a 4 °C e as células ressuspensas em solução de NaCl 0,9% de maneira asséptica, de acordo com a seguinte proporção: cada 30 mL de meio centrifugado foram ressuspensos em 0,5 mL de solução de NaCl 0,9% esterilizada. Essa suspensão foi transferida para 30 mL de uma solução de quitosana a 4 %, previamente dissolvida em 1% de ácido acético, e autoclavada 110 °C por 10 minutos.

Esta suspensão de células em quitosana foi homogeneizada durante dez minutos com o auxílio de um bastão de vidro, e em seguida foi mantida em repouso por 10 minutos. Então 5,0 mL desta solução foram utilizados para preencher uma seringa de 10 mL, sendo em seguida, gotejado em uma solução de NaOH a 8 % para a coagulação e formação dos *beads*. Os *beads* permaneceram nesta solução durante 40 minutos, em agitador magnético, a fim de aumentar sua consistência. Em seguida, foram lavados com 200 mL de solução de NaCl 0,9% esterilizada, permanecendo por 10 minutos e repetindo-se este procedimento duas vezes. Toda a preparação dos *beads* foi realizada sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar (Labconco, USA). Após estas lavagens, os *beads* foram usados nos testes de biodegradação de n-Hexadecano a 1 %. Ao final do ensaio de biodegradação, os *beads* foram assepticamente peneirados e estocados sob refrigeração a 4 °C em solução de NaCl 0,9% esterilizada, para posterior utilização nos estudos de microscopia eletrônica.

3.13 - Resistência da Linhagem Seleccionada à Variações de pH.

Foram preparadas soluções de NaCl (0,9 %) com valores de pH ajustados para a faixa de pH de 1 a 14, com soluções de HCl/NaOH a 1 N. A linhagem 831 foi inoculada nestes tubos contendo solução salina nos diferentes valores de pH na proporção de 10% (v/v). Os tubos foram incubados a 35 °C e alçadas foram estriadas em placas de Petri contendo meio de

TSA após de 1h e 24 horas de contato. Após 24 h de incubação a 35 °C, as placas foram analisadas visualmente para a verificação do crescimento.

3.14 – Ensaios de Biodegradação com Células Livres e Imobilizadas

Os ensaios de biodegradação, tanto com células livres quanto com células imobilizadas, foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio BH com 1 % de n-Hexadecano e 10 % de inóculo, preparado a partir de uma cultura crescida em TSB com absorvância de $1,00 \pm 0,02$.

Os frascos permaneceram sob agitação de 160 rpm, por um período de seis dias, sendo retiradas amostras a cada dois dias para a aferição do pH, absorvância, densidade celular, potencial de emulsificação e quantificação de proteínas e açúcares. Concomitantemente, foram preparadas culturas nas mesmas condições, exclusivamente para as análises cromatográficas. Essas culturas foram avaliadas também a cada dois dias durante os seis dias.

3.15 – Teste de Emulsificação

A determinação da capacidade emulsificante dos sobrenadantes das culturas foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Cooper & Goldenberg (1987) e modificada por Iqbal *et al.* (1995). O método consiste em adicionar 2 ml de querosene à mesma quantidade da amostra em um tubo de ensaio com tampa rosqueada, e agitar vigorosamente (*vortex*) por 2 minutos. Os tubos são deixados em repouso por 24 h, à temperatura ambiente (25 °C), e o percentual de emulsificação (E24) é calculado, dividindo-se a altura da camada emulsificada (mm) pela altura da camada total de líquido (mm), multiplicando-se por 100. Para facilitar a visualização das camadas é acrescentado 200 µL de uma solução a 0,05% do corante Rosa Bengala, antes da agitação

3.16 – Determinação de Proteína

A concentração de proteínas foi mensurada pelo método de Bradford (1976). As alíquotas, retiradas dos frascos dos ensaios de biodegradação com células livres e imobilizadas, foram centrifugadas a 10.000 g por 10 min a 4 °C. 100 µL dos sobrenadantes das culturas foram misturados com 2,5 mL do reagente de Bradford, agitou-se em *vortex* por 30 segundos, colocados em repouso e após 10 minutos leu-se a absorvância a 595 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e a determinação de proteínas estimada a partir de uma curva padrão preparada com a proteína albumina sérica bovina (BSA).

3.17 – Determinação de Carboidrato

A concentração de carboidratos foi quantificada pelo método de Dubois et al. (1956). Alíquotas, retiradas dos frascos dos ensaios de biodegradação com células livres e imobilizadas, foram centrifugadas a 10.000 g por 10 min a 4 °C. Para o ensaio, 500 µL desses sobrenadantes foram misturados a 500 µL de Fenol a 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico. Os tubos foram agitados durante 30 segundos e deixados descansar durante 30 minutos, após este tempo a absorvância foi mensurada a 490 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e a determinação de açúcares redutores estimada a partir de uma curva padrão construída com glicose.

3.18 – Atividade Hemolítica

A pesquisa de hemolisina foi feita em placas de Agar Sangue (DIFCO-USA). Para o teste, uma gota da cultura cultivada em meio de TSB, em fase exponencial de crescimento, foi inoculada na superfície da placa de agar Sangue. As placas foram incubadas a 35 °C durante 48 horas e observadas visualmente para verificar a presença de halos de hemólise ao redor das colônias (BANAT, 1993).

3.19 – Quantificação da Densidade Celular

O crescimento bacteriano durante os ensaios de biodegradação foi avaliado através de medidas de absorvância em espectrofotômetro a 600 nm e contagens de unidades formadoras de colônia (UFC/mL), feita pelo método de diluição em placa.

A densidade da população de bactérias nos *beads* de quitosana foi estimada através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/g) em placas com TSA. Para tanto, ao final dos experimentos de biodegradação os *beads* foram peneirados, dissolvidos em solução de NaCl 0,9%, na proporção 1:10 (p/v) e triturados em um homogeneizador elétrico, sob condições estéreis. Dessa solução foram preparadas diluições decimais, também, em solução de NaCl 0,9% e, em seguida, 100 µL de cada diluição foram transferidos para placas de Petri contendo meio de TSA, sempre em duplicada. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h quando então as colônias foram contadas.

3.20 - Análises Cromatográficas

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa foi empregada para analisar os percentuais de degradação do n-Hexadecano pelas células livres e imobilizadas em quitosana ao final dos ensaios. Estas análises foram realizadas no PATEDEC (Parque de Desenvolvimento Tecnológico – Central de Analítica I – Laboratório de Cromatografia Sistema GC-MS – Shimadzu GC-MS QP5050). As condições operacionais deste sistema encontram-se listadas na Tabela 3.6.

Ao final dos ensaios de biodegradação, as culturas foram centrifugadas a 10.000 g por 10 min a 22 °C e os sobrenadantes foram extraídos com diclorometano (Vetec – Brasil) na proporção 1:3 (v/v), sendo agitados vigorosamente durante 60 segundos. Para se verificar a eficiência da metodologia de extração foram preparados, em triplicatas, frascos contendo o meio BH com 1 % de n-Hexadecano.

Tabela 3.6: Condições Operacionais do Sistema GC-MS

Parâmetros do sistema GC-MS	Valores
Temperatura Inicial de Injeção	25 °C
Temperatura da Interface	280 ° C
Modo de Controle	Split
Pressão de Entrada	97 Kpa
Fluxo da Coluna	1.5 mL/min
Velocidade Linear	44.9 cm/seg
Fluxo Total	50 mL/min
Tempo de Equilíbrio	8.0 min
Parâmetros da Coluna	Descrição/Valores
Nome	DB-5
Número de Série	US 1372915H
Espessura	0.25µm
Comprimento	25 metros
Diâmetro Interno	0.25 mm

3.21– Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise dos *beads* por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada na Universidade Católica de Pernambuco, sob a supervisão da profa. Dra. Aline Elesbão do Nascimento.

Para o estudo da ultraestrutura, três grupos de amostras foram processadas: A - amostras submetidas à secagem em estufa a 35 °C; B - amostras liofilizadas, após congelamento a -20 °C e C - amostras liofilizadas, após congelamento em nitrogênio líquido.

Para a visualização no MEV, as amostras do tipo A foram lavadas em tampão fosfato de sódio (PBS), pH 7,2, por duas vezes, durante 10 minutos. Em seguida, foram fixadas com glutaraldeído 2,5% preparado em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 1 hora, à temperatura ambiente (25 °C). Após a fixação, as amostras foram novamente lavadas com tampão fosfato, duas vezes, durante 10 minutos. Seguiu-se a pós-fixação com tetróxido de ósmio a 1%, em tampão fosfato 0,1 M, durante 1 hora a 27 °C, no escuro. Em seguida, as amostras foram mais uma vez lavadas com tampão fosfato 0,1 M, sendo posteriormente destinadas ao processo de desidratação em estufa a 37 °C. Posteriormente, foram montadas em suportes de alumínio, observadas e fotografadas ao microscópio eletrônico de varredura, JEOL LV 5600, operando a 12KV e 15KV, respectivamente.

As amostras do tipo B foram montadas em suporte de alumínio, observadas e fotografadas ao microscópio eletrônico de varredura, JEOL LV 5600, operando a 20KV.

As amostras do tipo C foram montadas em suporte de alumínio, observadas e fotografadas ao microscópio eletrônico de varredura, JEOL LV 5600, operando a 15KV.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Seleção de Linhagens Biodegradadoras de n-Hexadecano

Dentre as quarenta e uma bactérias testadas, duas cresceram de forma satisfatória no meio de Büshnell-Haas com 1 % de n-Hexadecano (Figura 4.1). Uma delas, a linhagem UFPEDA-831, foi proveniente da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE, e a outra identificada como UFPEDA-840, foi isolada de um frasco de n-Hexadecano.

As linhagens UFPEDA 831 e UFPEDA 840 mostraram desempenhos superiores as demais 39 linhagens testadas, como pode ser revelado pelo monitoramento das culturas. Enquanto as absorvâncias das culturas ficaram em média ao redor de 0,298 com 72 horas, as linhagens UFPEDA 831 e UFPEDA 840 atingiram valores de 2,140 e 2,075 neste mesmo tempo, respectivamente (Figura 4.1).

Como descrito na literatura, os composto alifáticos de cadeia normal são geralmente mais fáceis de serem biodegradados do que os ramificados e os aromáticos (BAKER & HERSON, 1994), sendo os alcanos com números de átomos de carbono entre C_{10} - C_{24} mais rapidamente degradados pelos microrganismos (MÜLLER-HURTIG et al., 1993). Isto pode explicar o fato de que embora as cepas UFPEDA 831 e UFPEDA 840 tenham sido mais eficientes em degradar o n-Hexadecano, a maioria das linhagens testadas neste trabalho também foi capaz de catabolizar o referido hidrocarboneto.

O n-Hexadecano é um composto bastante utilizado como modelo para a biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos de cadeia normal, além de ser o componente majoritário do óleo Diesel.

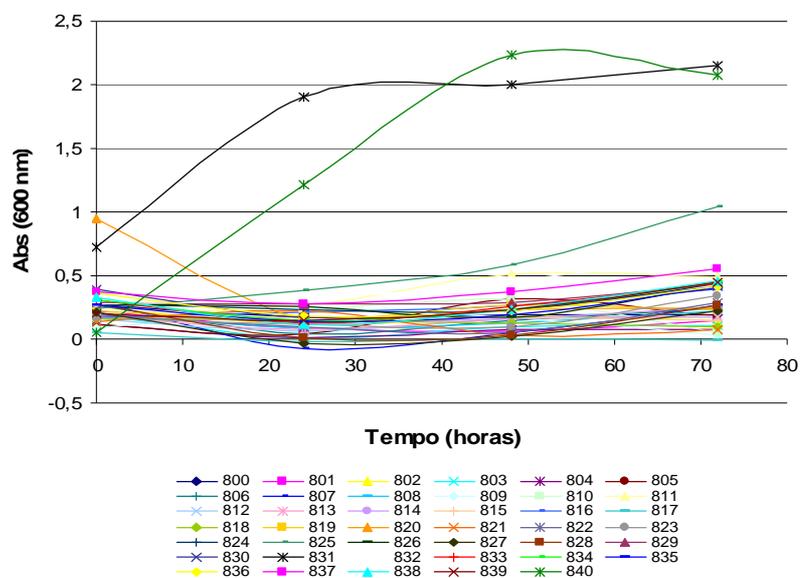


Figura 4.1 – Crescimento das quarenta e uma linhagens bacterianas em n-Hexadecano a 1%

A Figura 4.2 mostra o crescimento das duas linhagens selecionadas, comparando o crescimento desses microrganismos nas duas fontes de carbono testadas: n-Hexadecano e glicose (controle). Observa-se que as duas linhagens cresceram preferencialmente em n-Hexadecano, mostrando que estão mais adaptadas a esta fonte de carbono do que em glicose. Segundo Chénier et al. (2003), esta habilidade se deve ao fato do n-Hexadecano ser bastante encontrado em ambientes aquáticos, sob influência de atividades petrolíferas, o que provavelmente pode ter contribuído para a seleção natural desses microrganismos.

Com relação à origem das linhagens selecionadas neste trabalho e sua relação com seu potencial em degradar hidrocarbonetos, pode-se afirmar que como a linhagem UFPEDA 831 foi isolada do Terminal Portuário de Suape-Pe, onde existe um grande transporte de hidrocarbonetos, como o óleo Diesel e a linhagem UFPEDA 840 foi isolada de um frasco contendo n-Hexadecano estas linhagens possuem um maior potencial em degradar hidrocarbonetos de cadeia longa do que outras fontes de carbono, tais como a glicose, testada neste ensaio.

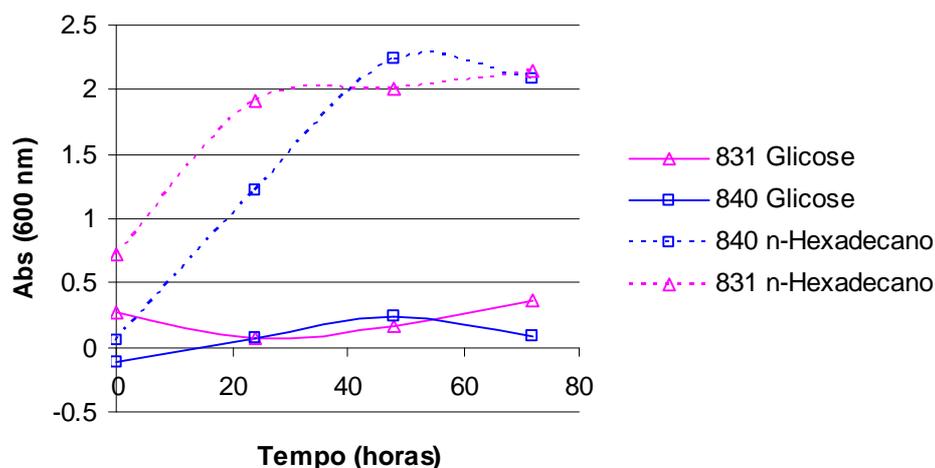


Figura 4.2 – Crescimento das linhagens selecionadas UFPEDA 831 e UFPEDA 840 em glicose e em n-Hexadecano.

As curvas de crescimento das linhagens UFPEDA 831 e UFPEDA 840 em meio de TSB podem ser observadas na Figura 4.3 e mostram que ambas as cepas estão em fase exponencial de crescimento no período compreendido entre 4 e 9 horas. Estas curvas de crescimento foram efetuadas para a padronização dos inóculos utilizados nos ensaios de biodegradação.

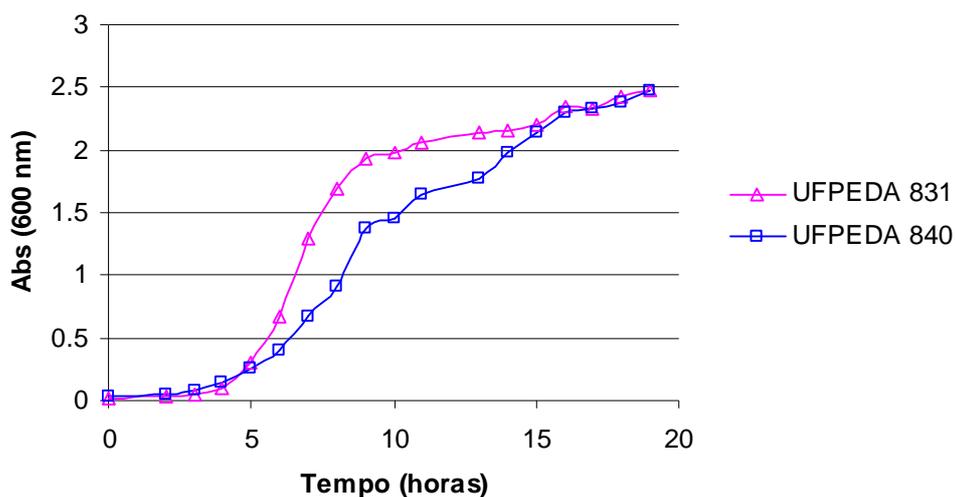


Figura 4.3 – Curva de crescimento da linhagem UFPEDA 831 e UFPEDA 840 em meio de TSB, durante 19 horas à temperatura ambiente sob agitação de 160 rpm.

4.2 – Identificação das Linhagens Bacterianas Seleccionadas

Os resultados de identificação com base no perfil de ácidos graxos foram suficientes para a identificação da bactéria UFPEDA-840, *Ochrobactrum anthropi* CDC, grupo Vd (índice de similaridade – IS = 0.808). Entretanto, não foram suficientes para a identificação da bactéria UFPEDA 831, apresentando índices de similaridades semelhantes com a espécie *Bacillus pumilus*, subgrupo B (índice de similaridade – IS = 0.662) e com a espécie *Bacillus megaterium*, subgrupo A (índice de similaridade – IS = 0.512). Também não foi possível a diferenciação dessas duas espécies através das provas bioquímicas sugeridas no Manual de Bergey (HOLT et al.,1994), pois os únicos teste que as diferenciariam seriam o de Voges Proskauer (VP) e a utilização de amido, que forneceriam respostas para as linhagens-tipo, positiva e negativa para *Bacillus pumilus*, e negativa e positiva para *Bacillus megaterium*, respectivamente, entretanto neste trabalho a linhagem UFPEDA 831 foi negativa para ambas as provas (Tabela 4.1.) A caracterização cultural, morfológica e fisiológica das duas linhagens encontra-se listada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Caracterização macroscópica e microscópica das linhagens selecionadas, provas bioquímicas testadas e o efeito dos fatores físicos no crescimento celular.

Caracterização	Linhagens	
	<i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 831	<i>Ochrobatrium anthropi</i> UFPEDA 840
Efeito dos Agentes Físicos no Crescimento		
Radiação UV (260 nm)	≤ 8 minutos	-
Temperatura Mínima	16° C	20° C
Temperatura Máxima	50° C	38° C
Salinidade (w/v)	> 10 %	≤ 2 %
pH mínimo	5	5
pH Máximo	11	9
Características Macroscópicas e Microscópicas		
Tamanho da colônia	2 mm	Menor que 1 mm
Forma da colônia	Circular	Puntiforme
Quanto à elevação	Plana	Elevada
Quanto aos bordos	Ondulado	Inteiro
Cromogênese	Sem pigmentação	Sem pigmentação
Detalhes ópticos	Opaca	Brilhante
Superfície	Rugosa	Lisa
Odor	Com odor	Com odor
Quanto à coloração de Gram	POSITIVA	NEGATIVA
Esporos	Presente	Ausente
Motilidade	Ausente	Ausente
Morfologia	Bastonete	Bastonete
Provas Bioquímicas e Pesquisa Enzimática		
Hidrólise de:		
Amido	-	-
Gelatina	+	-
Quitosana	-	-
VM	+	-
VP	-	-
Motilidade	-	-
Indol	-	-
Citrato	-	-
H ₂ S	-	-

Sendo assim a linhagem UFPEDA 831 foi encaminhada a Divisão de Recursos Microbianos CPQBA/UNICAMP, Campinas-SP, sob a responsabilidade da Dra. Valéria Maia de Oliveira, para fins de identificação genética, sendo então encontrado um índice de similaridade de 98-99% com seqüências de rDNA 16S de *Bacillus pumilus* presentes nas bases de dados, a partir de uma seqüência de rDNA 16S de cerca de 1400 pb.

O gênero *Bacillus* consiste de um grande e heterogêneo grupo de bactérias Gram-positivas ou Gram-variáveis, aeróbicas, com formato de bastonete e formadoras de

endósporos, que podem ser isoladas de uma imensa variedade de ambientes: água, solo, associadas às plantas, ambientes poluídos, sedimentos marinhos, etc. Devido à grande resistência de seus esporos e da alta habilidade metabólica das células vegetativas, este gênero é um dos grupos de microrganismos mais importantes comercialmente. São, de forma geral, bactérias consideradas próprias do meio ambiente, sendo muitas espécies saprófitas e algumas patogênicas para insetos. Além disso, diversos estudos de microbiologia ambiental comprovam a participação de espécies de *Bacillus* nos mais diversos ciclos biogeoquímicos. Existe ainda, registro de espécies com alta significância clínica, como o *B. anthracis* e o *B. cereus* (ENCINAS et al., 1996).

Segundo o Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey (HOLT et al., 1994) o gênero *Bacillus* compreende espécies com as seguintes características: “São bastonetes móveis, que podem ocorrer de forma isolada ou em cadeia, produzem esporos resistentes a condições adversas, não apresentando mais de um esporo por célula, a esporulação não é reprimida pela exposição ao ar. São aeróbios ou anaeróbios facultativos, apresentando ampla diversidade fisiológica no que diz respeito à temperatura, pH e salinidade. Os integrantes deste gênero podem ser encontrados em diversos habitats e poucas espécies são patogênicas aos vertebrados e invertebrados”.

O somatório destas características tem atraído grande interesse dos mais diversos setores industriais (SCHALLMEY et al., 2004). As espécies do gênero *Bacillus* já são reconhecidas comercialmente como produtoras de antibióticos e outras drogas, inseticidas, biossurfactantes, compostos químicos e enzimas (IVANOVA et al., 1999).

Atualmente, o mercado mundial da indústria de biossurfactantes excede 3 milhões de toneladas por ano (GOUVEIA et al., 2003). A espécie *B. subtilis* e outras espécies de *Bacillus* dominam este mercado (SCHALLMEY et al., 2004).

Várias espécies de *Bacillus* têm demonstrado potencial para crescer e ainda produzir biossurfactantes em ambientes extremos. Banat (1994) isolou uma linhagem de *Bacillus* termotolerante, produtor de biossurfactante, que crescia até 50 °C em meio contendo hidrocarbonetos, sendo utilizado para a recuperação melhorada de petróleo (MEOR). Outra espécie de *Bacillus*, o *B. licheniformis*, usado *in situ* para a recuperação de óleo, cresce em meio com até 10% de NaCl, em temperaturas de até 50 °C e pH variando de 4,6 a 9,0.

A partir de Quarenta linhagens bacterianas pertencentes à Coleção do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Lima (2005) selecionou uma

linhagem de *Bacillus*, o *B. megaterium* que foi capaz de degradar as três formas isoméricas de xileno. Isto demonstra o potencial do gênero *Bacillus* dentre as linhagens estudadas.

A outra linhagem selecionada, identificada como *Ochrobactrum anthropi* foi classificada por Holmes et al. (1988), embora tenha sido inicialmente classificada no *Center for Disease Control* (CDC- Atlanta, GA, USA) como sendo do gênero *Achromobacter* grupo Vd. Trata-se de uma espécie reconhecida como patógeno oportunista, geralmente isolada do trato urogenital, urinário, respiratório e auditivo de humanos. Poucas linhagens são isoladas a partir de fezes, olhos, aparatos hospitalares e do ambiente. Essa espécie também tem potencial para aplicação em biorremediação, tendo sido isolada uma linhagem a partir de lodo ativado com grande capacidade para degradar o herbicida atrazina, como única fonte de carbono e energia (Laura et al., 1996).

As provas bioquímicas realizadas com *O. anthropi* confirmaram as informações obtidas a respeito deste gênero em *The Prokaryotes* (2006), onde diz que “as espécies deste gênero são Gram-negativas, estritamente aeróbicas, que demonstram atividade de catalase e oxidase, indol não é produzido e não produzem enzimas extracelulares para a hidrólise de Tween 80, DNA, gelatina, amido e caseína”. Deve-se ter cautela em usar o sistema de identificação API 20NE da bioMérieux (França) que a identificará como *Achromobacter* sp.

Observa-se na Tabela 4.1 que *B. pumilus* foi capaz de crescer em faixas maiores de temperatura, pH, e salinidade, do que *O. anthropi*, além de suportar um maior tempo de exposição à radiação ultravioleta (8 minutos). Esta adaptação aos efeitos físicos faz da linhagem *B. pumilus* uma forte candidata para aplicações ambientais, até mesmo em ambientes marinhos, já que suportou salinidade superior aquela encontrada neste ambiente, 3,2 – 3,8 % (w/v), além disto, na natureza os ambientes são dinâmicos e estas adaptações favorecem seu desempenho.

Na Figura 4.4 pode-se observar o aspecto colonial e microscópico das linhagens selecionadas, e resposta tintorial ao Gram. Na mesma figura pode-se também observar os esporos formados por *B. pumilus*.

Muitos trabalhos citam as duas espécies selecionadas como degradadoras de hidrocarbonetos (EL-SAYED et al., 2003; CALVO, et. al, 2004) e como produtores de biossurfactantes (BANAT, 1994; DESAI E BANAT, 1997; VAN HAMME, et al., 2003; MULLIGAN, 2005; CALVO et al., 2004). Rahman et al. (2002) isolaram 130 culturas puras

com capacidade para utilizar óleo cru, como única fonte de carbono e energia e dentre estas, o gênero *Bacillus* foi um dos grupos dominantes.

Gestel et al.(2003), estudando a biodegradação de amostras de solo contaminados com Diesel em processo de compostagem, identificaram que nas duas primeiras fases da compostagem o gênero *Bacillus* era dominante, enquanto que nas fases posteriores: de resfriamento e de maturação, outras Gram+ (*Gordona*, *Micrococcus*, *Actinomadura*) e Gram - (*Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Ochrobactrum*) dominavam.

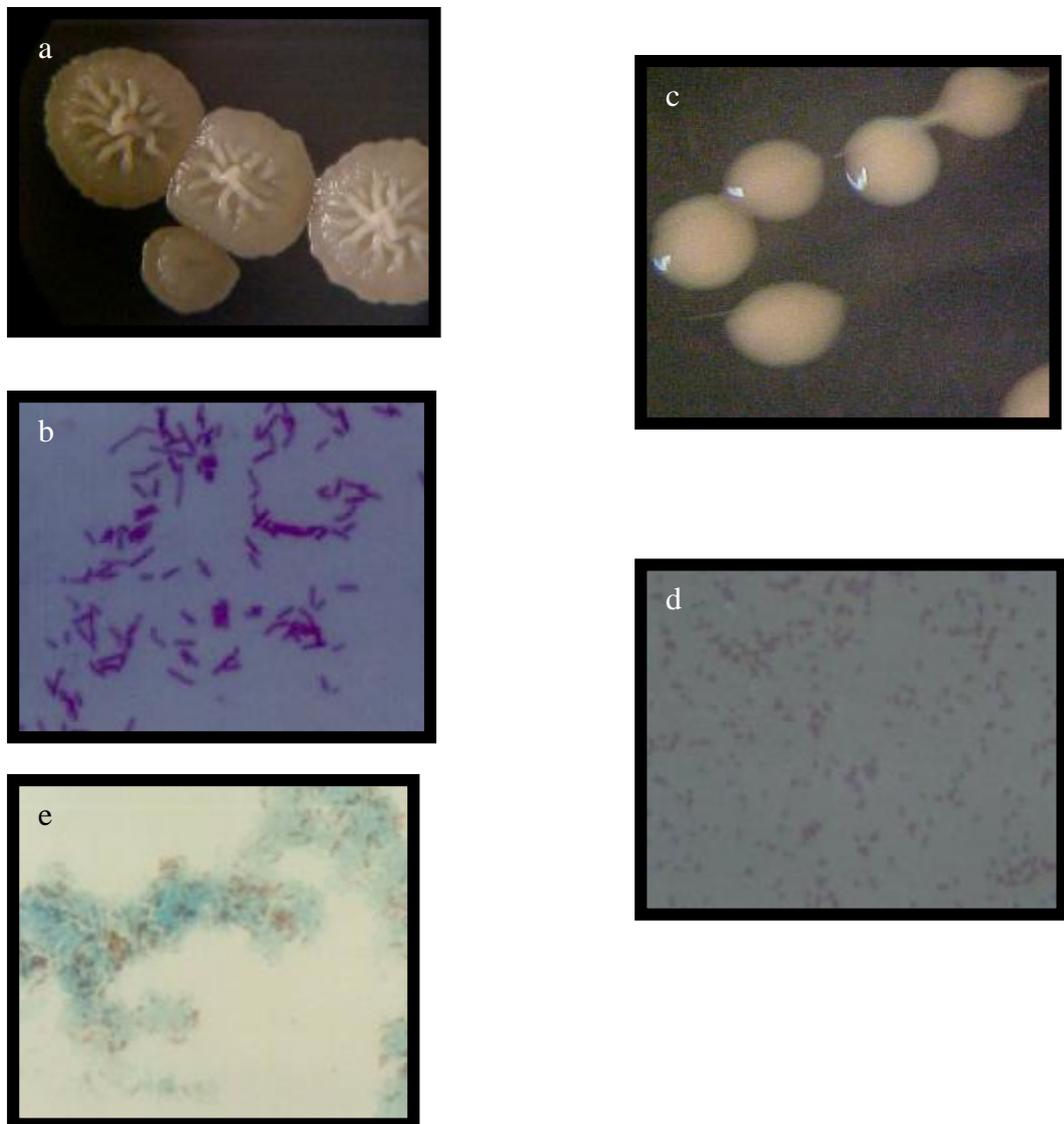


Figura 4.4: Aspecto Colonial e Resposta Tintorial ao Gram das Bactérias *B. pumilus* (a,b); e *Ochrobactrum anthropi* (c, d). Detecção de Esporos em *B. pumilus*, em verde (e).

4.3 – Antibiógrama

As linhagens de bactérias selecionadas neste trabalho foram testadas quanto à sensibilidade a antibióticos. Como mostra a Tabela 4.2, *B. pumilus* mostrou-se sensível à maioria dos antibióticos testados, sendo resistente a apenas dois deles, clindamicina e nitrofurantoína. A bactéria *O. anthropi*, ao contrário, foi resistente a maioria deles, isto é, nove dos doze antibióticos testados. Este resultado está de acordo com a literatura que retrata que esta última bactéria se apresenta, em geral, resistente a cefalosporinas e penicilinas, sendo suscetível a carbapenem, quinolonas e tetraciclinas. (Higgins et al., 2001).

O fato de *B. pumilus* ser mais sensível a um maior número de antibióticos do que *O. anthropi* reforça seu potencial para aplicações em biorremediação de, pois ao mesmo tempo que apresenta características favoráveis para tal finalidade esta linhagem pode ser facilmente controlada.

Tabela 4.2: Sensibilidade das bactérias *B. pumilus* e *O. anthropi* a diversos antibióticos

Antibióticos	Concentração no disco (µg)	Bactérias	
		<i>B. pumilus</i>	<i>O. anthropi</i>
Ampicilina	10	Intermediário	Resistente
Clindamicina	2	Resistente	Resistente
Cloranfenicol	30	Intermediário	Resistente
Eritromicina	15	Sensível	Resistente
Gentamicina	120	Sensível	Resistente
Nitrofurantoína	300	Resistente	Resistente
Oxacilina	1	Intermediário	Resistente
Penicilina	10	Sensível	Resistente
Sulfazotrim	25	Sensível	Sensível
Tetraciclina	30	Sensível	Sensível
Tobramicina	10	Intermediário	Intermediário
Vancomicina	30	Sensível	Resistente

4.4 – Crescimento das Linhagens *B. pumilus* e *O. anthropi* em Diferentes Concentrações de n-Hexadecano.

O desempenho das bactérias *Ochrobactrum anthropi* e *Bacillus pumilus* em concentrações variadas de n-Hexadecano, com diferentes intervalos de tempo, pode ser visualizado nas Figuras 4.5 e 4.6.

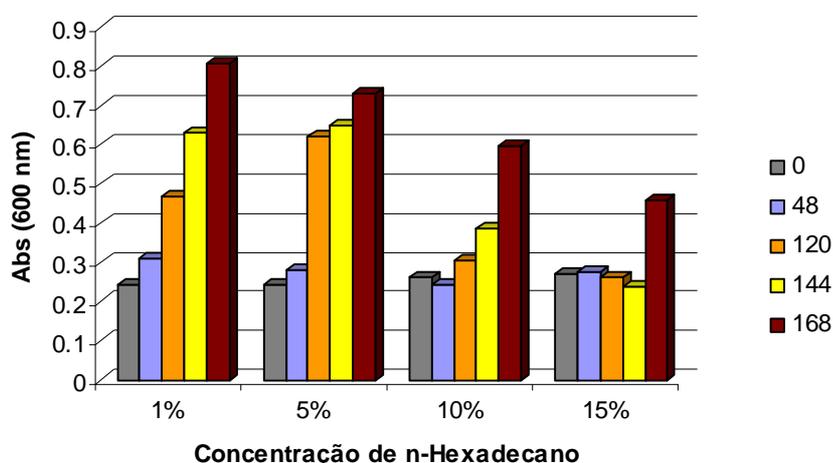


Figura 4.5: Crescimento da Bactéria *B. pumilus* em Concentrações Variadas de n-Hexadecano em Diferentes Tempos.

Observa-se nas Figuras 4.5 e 4.6 que tanto *O. anthropi* quanto *B. pumilus* cresceram melhor em concentrações menores de n-Hexadecano (1 a 5 %). Por este composto ter baixa toxicidade, levantou-se duas possibilidades para o fato observado, a primeira era de que ao se homogeneizar os tubos, caso as células fossem bastante hidrofóbicas, tenderiam a passar para a fase oleosa quanto maior fosse a sua concentração, e a segunda era de que quanto maior a camada de óleo no tubo o crescimento ficaria debilitado, devido à baixa transferência de oxigênio do ar para o meio de cultivo.

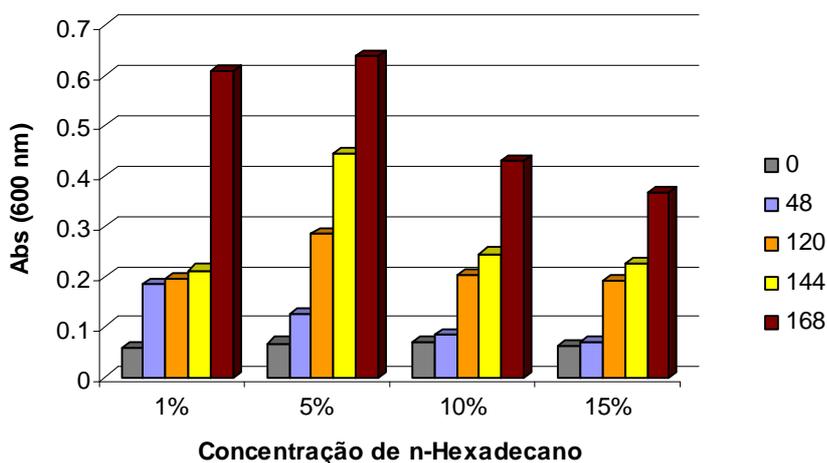


Figura 4.6: Crescimento da Bactéria *O. anthropi* em Concentrações Variadas de n-Hexadecano em Diferentes Tempos.

Nota-se também nas Figuras 4.5 e 4.6, que estas linhagens mostraram-se capazes de crescer em concentrações de até 15 % de n-Hexadecano, o que significa que são efetivas na captura desta fonte de carbono, que é imiscível em água (NOORDMAN et al, 2002). Essa captura provavelmente envolve algum mecanismo auxiliar como, por exemplo, a produção de biossurfactantes. Morikawa et al.(1992) isolaram e clonaram uma nova surfactina (lipopeptídeo) produzida por *Bacillus pumilus*, e Wasko & Bratt (1990) relataram a produção de um biossurfactante de natureza protéica por *Ochrobactrum anthropi*.

A Figura 4.7 mostra o crescimento de *B. pumilus* no tempo zero e após 168 horas de cultivo em n-Hexadecano, onde se observa a formação de uma espuma na camada superior do tubo, onde inicialmente se encontrava a camada de óleo.

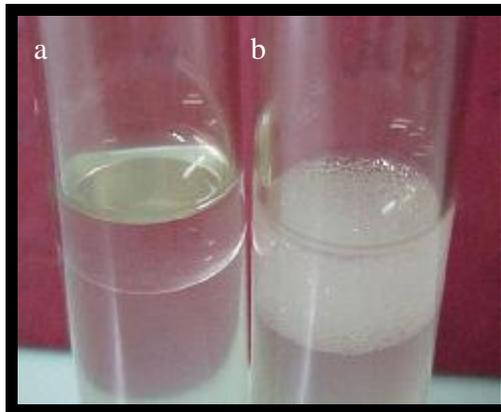


Figura 4.7: Aspecto do Ensaio de Biodegradação em Tubos, Utilizando a Bactéria *B. pumilus*: a) Tempo Zero e b) Após Sete Dias.

B. pumillus produziu hemolisina, detectada através de halos de hemólise em placa de agar Sangue (Figura 4.8), que é geralmente sugestivo da produção de biossurfactantes (MORAN et al., 2002). Essa hipótese foi confirmada com o resultado do ensaio de emulsificação do querosene. O sobrenadante da cultura de 168 h produziu um índice de emulsificação de 71%, já a linhagem de *O. anthropi* apresentou 54% de emulsificação, mas não apresentou atividade hemolítica (Figura 4.8). Esses resultados sugerem que essas duas linhagens de bactérias produzem biossurfactantes de natureza química diferente.

O ensaio de atividade hemolítica é um ensaio bastante usado para a detecção de surfactinas produzidas por cepas de *Bacillus*, sendo usado até para quantificar este

biossurfactante (MORAN et al. , 2002), pois existe um aumento no diâmetro da lise do ágar sangue com um aumento da concentração de surfactina. No entanto, nem todos os biossurfactantes possuem atividade hemolítica, como os biossurfactantes de baixa solubilidade e, além disso, outros compostos, bem como vírus, podem causar hemólise (YOUSSEF et al., 2004).

Puntus et al. (2005) estudando 45 linhagens bacterianas degradadoras de n-Hexadecano verificaram que 75 % destas linhagens foram capazes de produzir biossurfactantes.

Atividades emulsificantes acima de 40% já são suficientes para encorajar a pesquisa de biossurfactantes. A atividade emulsificante de *B. pumilus* (71 %) foi superior a de *O. Anthropi* (54 %), o que poderia ser mais um indicativo deste biossurfactante, produzido pela primeira linhagem, ser mais eficiente do que com a última. Entretanto, a habilidade de uma molécula formar emulsões estáveis não está sempre associada à diminuição da tensão superficial (YOUSSEF et al., 2004). Isto sugere a utilização de outras metodologias para se confirmar os resultados obtidos neste trabalho, além da utilização de outros substratos, tendo em vista que as linhagens de *B. subtilis* produzem biossurfactantes apenas em substratos hidrossolúveis (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

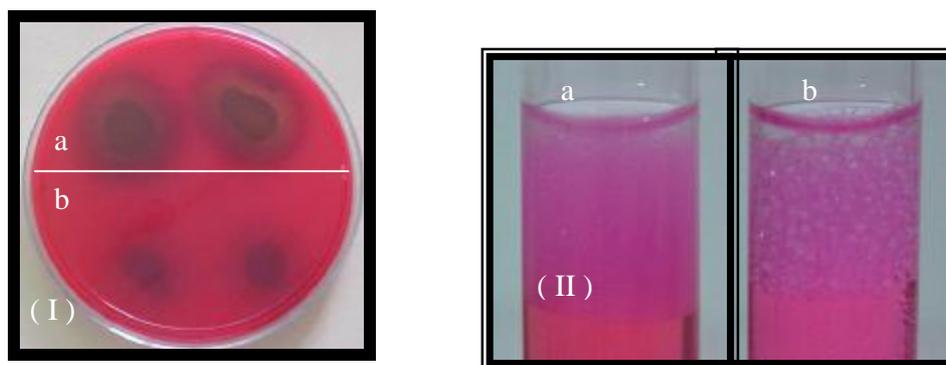


Figura 4.8: Atividade Hemolítica (I): (a) *Bacillus pumilus*, Positiva e (b) *Ochrobactrum anthropi*.Negativa. Aspectos da Emulsificação de Querosene (II): Promovidos Pelas Culturas de (a) *B. pumilus* e (b) *O. anthropi*.

4.5 – Verificação da Hidrofobicidade Celular

A padronização do inóculo para este experimento em espectrofotômetro foi de absorvância de $0,200 \pm 0,020$, o que equivalente a $6,8 \pm 0,30 \times 10^7$ UFC/mL para a linhagem UFPEDA 831 e $5,0 \pm 0,45 \times 10^8$ UFC/mL para a linhagem UFPEDA 840. Verificou-se neste ensaio que as duas bactérias selecionadas não apresentaram uma alta hidrofobicidade, o que corrobora com os resultados de maior crescimento das culturas em concentrações mais baixas de n-Hexadecano. Menores taxas de crescimento ocorreram em concentrações mais altas, provavelmente devido a problemas de transferência do oxigênio atmosférico para o meio, dificultado pela camada de óleo formada nos tubos, e não ao fato das células tenderem a sair da fase aquosa para a fase oleosa quando agitadas, o que teria sido evidenciado pela diminuição das leituras de absorvância. Os resultados, descritos na Tabela 4.3, demonstram que não houve diferença significativa nas absorvâncias antes e depois da agitação das culturas com n-Hexadecano em *vortex* durante dois minutos.

Tabela 4.3: Influência do Aumento da Concentração de n-Hexadecano Antes e Depois de Agitação em Vortex Durante 60 Segundos, nas Absorvâncias do Meio Contendo Bactérias.

Concentração de n-Hexadecano (%)	<i>Bacillus pumilus</i>		<i>Ochrobactrum anthropi</i>	
	Absorvância (600 nm)		Absorvância (600 nm)	
	Antes	Depois	Antes	Depois
1%	$1,24 \pm 0,02$	$1,19 \pm 0,01$	$1,05 \pm 0,03$	$1,09 \pm 0,02$
2%	$1,24 \pm 0,07$	$1,19 \pm 0,06$	$0,95 \pm 0,01$	$0,99 \pm 0,01$
5%	$1,19 \pm 0,01$	$1,16 \pm 0,01$	$1,08 \pm 0,14$	$1,14 \pm 0,17$
10%	$1,29 \pm 0,09$	$1,32 \pm 0,11$	$1,16 \pm 0,19$	$1,20 \pm 0,14$
20%	$1,33 \pm 0,04$	$1,37 \pm 0,08$	$1,35 \pm 0,12$	$1,40 \pm 0,007$

Estes mesmos resultados expressos em percentual estão mostrados na Tabela 4.4. Esses resultados confirmam que estas linhagens de bactérias não são hidrofóbicas por natureza, a não ser que as características de suas membranas celulares fossem modificadas, ao final de longo período de exposição a hidrocarbonetos, como proposto por Van Hamme (2003), para bactérias que crescem em hidrocarbonetos.

Tabela 4.4: Percentual de Hidrofobicidade (H) das Linhagens Bacterianas em Diferentes Concentrações de n-Hexadecano.

Bactérias	Concentração de n-Hexadecano				
	1 %	2 %	5 %	10 %	20 %
<i>B. pumilus</i>	3,83 %	3,55 %	1,97 %	- 3,23	- 2,89 %
<i>O. anthropi</i>	- 3,77 %	- 4,58 %	- 5,28 %	- 3,84 %	3,84 %

4.6 – Imobilização da Bactéria em Quitosana.

As linhagens selecionadas, como potenciais degradadores de hidrocarbonetos, foram testados quanto à possibilidade de serem imobilizados em quitosana (GD 78 %). A triagem para esta etapa foi realizada pelos testes: de avaliação do efeito da quitosana sobre as linhagens e do potencial para produzir a enzima quitosanase.

Zheng & Zhu (2003), encontraram que concentrações de 1% de quitosana de pesos moleculares variando de 5 até 305 kDa, foram suficientes para inibir 100% das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados deste trabalho mostraram que a linhagem de *B. pumilus* foi resistente até 4% de quitosana enquanto que *O. anthropi* não resistiu a 1% de quitosana após 24 horas de exposição (Figura 4.9). Esta resistência a altas concentrações de quitosana fez de *B. pumilus* um candidato apropriado para os testes de imobilização.

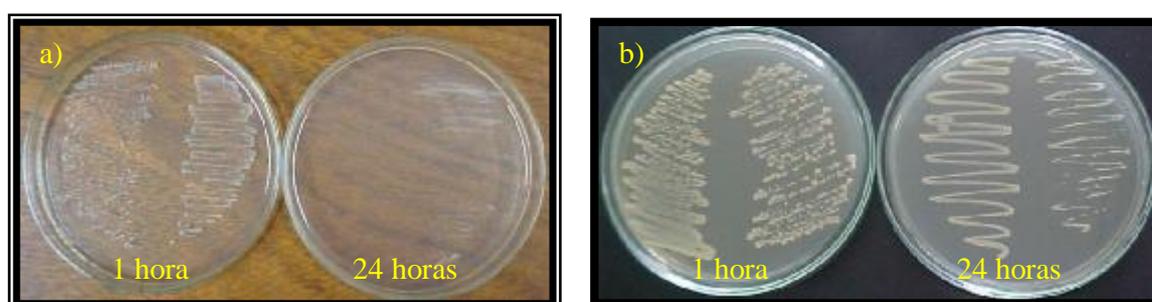


Figura 4.9: Ensaio de Avaliação do Efeito da Quitosana Sobre as Linhagens: a) *O. anthropi* e b) *B. pumilus* Ambas com 1h e 24 horas de Incubação em Quitosana a 4%.

Embora fosse sabido que a quitosana exibe atividade antibacteriana somente em meio ácido, devido sua baixa solubilidade acima de pH 6.5 (RABEA et al., 2003), e que os experimentos de imobilização subseqüentes não ultrapassariam o tempo de exposição de 1

hora a esta quitosana solúvel, utilizou-se a bactéria *B. pumilus* para os ensaios de imobilização devido a todas suas características de maior resistência apresentadas, bem como a imobilização seria executada em quitosana a 4 %, sendo os *beads* mais estáveis à agitação, necessária nos experimentos de biodegradação.

Segundo Rabea et al. (2003), quitosanas de pesos moleculares acima de 129 kDa são mais tóxicas a partir de concentrações de 0,5 %, e de forma mais acentuada para microrganismos Gram-positivos, como o *S. aureus*. Além de ter sido testada uma quitosana de massa molecular mais baixa, 117 kDa, a resistência de *B. pumillus* a quitosana pode ser atribuída, também, a presença de endosporos, o que torna esse microrganismo muito mais resistentes a diversos fatores ambientais.

Nenhuma das bactérias selecionadas demonstrou a produção de quitosanase para o teste utilizado (Figura 4.10), o que é de fundamental importância, pois se estas bactérias fossem imobilizadas em um suporte que elas degradassem, a imobilização ficaria comprometida. Observe nesta figura que a bactéria controle, fornecida pelo LAMI, apresentou halo, enquanto que as bactérias testadas não apresentaram halos.

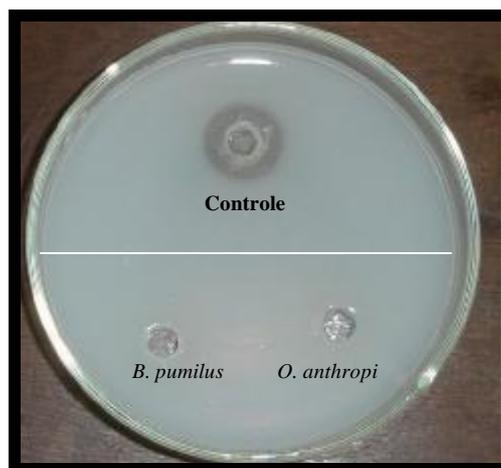


Figura: 4.10: Atividade quitosanásica em *B. pumilus* (negativa) e *O. anthropi*. (negativa)

A digestibilidade de *beads* de quitosana somente é desejada quando, por exemplo, da imobilização de esporos, onde se deseja sua liberação para o meio ambiente e sua subsequente germinação, a fim de que ocorram as reações no sítio alvo desejado e em tempo relativamente programado, como proposto por Jobin et al. (2005).

A maioria das bactérias e fungos que produzem estas enzimas, constitutiva ou indutivamente, as secretam extracelularmente, enquanto que as quitosanases intracelulares são encontradas geralmente em plantas. As quitosanases de diversas fontes mostram diferentes padrões de ação hidrolítica, os quais dependem do grau de polimerização e desacetilação do substrato, sendo, em sua grande maioria, de natureza induzível. Segundo Somashekar & Joseph (1996) e Omusaba et al. (2000), *B. pumilus* produz quitosanase indutivamente que são bastante específicas, sendo produzidas na presença de quitosanas com grau de desacetilação entre 65-75%, o que indica que a linhagem estudada não possui esta capacidade, ou que esta diferença no grau de desacetilação da quitosana usada (78 %) foi suficiente para não induzir a produção da enzima (Piza et al., 1999).

B. pumilus mostrou-se resistente também, ao teste de resistência a variação de pH em solução salina, durante 1 e 24 horas sendo, portanto capaz de suportar as variações de pH necessárias no processamento das esferas, pois os valores variam de pH 5,39 (quitosana em solução) e ao pH 14 (solução de NaOH), no tempo do experimento de produção dos *beads* (período máximo de 1 hora).

Os *beads* produzidos, segundo a metodologia proposta neste trabalho, mostraram-se consistentes, uniformes e estáveis à agitação, possuindo em média um diâmetro de 3 mm (Figura 4.11). Tamanho similar às esferas produzidas por Wang et.al. (2005) e Valentini et al. (2000). A concentração de 4 % de gel de quitosana e o tamanho das esferas produzidas possibilitam uma melhor eficiência no aprisionamento de células.

O peso úmido dos *beads* (~5mL) ficou em torno de $4,87g \pm 0,28$ e não houve variação significativa entre o início da biodegradação e seu término, após sete dias.

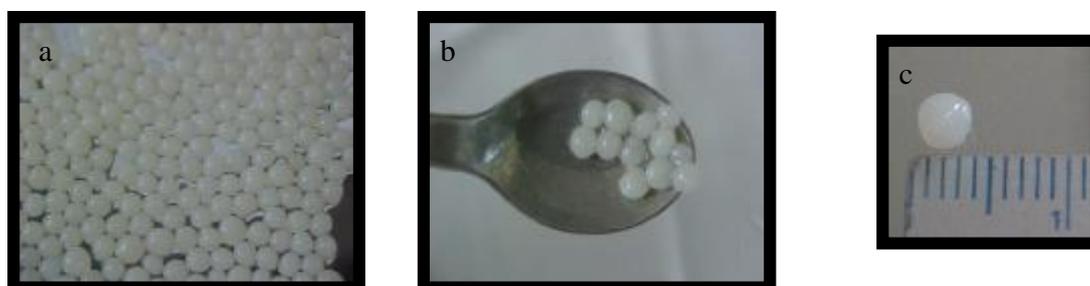


Figura 4.11: Aspecto Geral dos *Beads* de Quitosana com Células de *Bacillus pumilus* Aprisionadas (a, b); Diâmetro dos *Beads* Produzidos (c).

4.7 – Parâmetros Avaliados Durante a Biodegradação com Células Livres e Imobilizadas

Os ensaios de biodegradação do n-Hexadecano foram executados tanto com células de *B. pumilus* livres como imobilizadas em gel de quitosana a 4 % (GD 78 %). Nas Tabelas 4.5 e 4.6 pode-se observar todos os parâmetros avaliados, a cada dois dias, durante seis dias para a biodegradação com células livres e imobilizadas, respectivamente.

Iniciar os experimentos de imobilização com um número de densidade celular alto era essencial, tendo em vista que poderiam ocorrer perdas durante o processo de produção das esferas, devido a este fato realizou-se tanto o experimento com células livres, como imobilizadas com o mesmo número de unidades formadoras de colônias no inóculo.

Tabela 4.5: Parâmetros Avaliados Durante a Biodegradação com Células Livres.

Tempo	Absorvância (600 nm)	UFC/mL	pH	Proteína (µg/mL)	Carboidrato (g/mL)	E24
<i>Inóculo</i>	1,00 ± 0,027	5,1 × 10 ⁸ ± 5,23	-	-	-	-
0	0,255 ± 0,004	9,1 × 10 ⁷ ± 1,68	6,88 ± 0,01	9,14 ± 2,17	1,32 ± 0,17	0
48	0,675 ± 0,047	6,46 × 10 ⁸ ± 2,05	7,83 ± 0,03	42,31 ± 2,48	0,92 ± 0,08	0
96	1,21 ± 0,438	3,03 × 10 ⁸ ± 0,56	7,79 ± 0,02	44,90 ± 0,41	0,71 ± 0,09	0
144	1,28 ± 0,360	4,55 × 10 ⁷ ± 0,58	7,78 ± 0,11	43,84 ± 6,21	0,87 ± 0,19	0

Tabela 4.6 : Parâmetros Avaliados Durante a Biodegradação com Células Imobilizadas em Quitosana

Tempo	Absorvância	UFC		pH	Proteína (µg/mL)	Carboidrato (µg/mL)	E24
		Sobrenadante	Bead				
0	0,08 ± 0,004	0	6,8 × 10 ⁴ ± 1,68	7,24 ± 0,01	1,2 ± 0,87	27,34 ± 0,08	0
48	0,133 ± 0,063	0	9,2 × 10 ³ ± 0,81	7,37 ± 0,03	5,38 ± 3,51	39,52 ± 0,02	0
96	0,224 ± 0,076	5,8 × 10 ⁶	1,1 × 10 ⁷ ± 0,48	7,35 ± 0,02	2,73 ± 0,12	41,02 ± 0,00	0
144	0,352 ± 0,034	5,3 × 10 ⁵	4,6 × 10 ⁷ ± 3,33	7,39 ± 0,11	2,38 ± 0,50	38,03 ± 0,10	0

Nas Figuras 4.12 e 4.13 pode-se visualizar os frascos dos experimentos com células livres e imobilizadas nos tempos zero e após seis dias de incubação a 25° C, sob agitação de 160 rpm. A turvação do meio reacional ocorreu nos experimentos com células livres e imobilizadas. As absorvâncias medidas em ambos os experimentos foram crescentes, entretanto para os experimentos com células imobilizadas não se pôde estabelecer uma correlação entre esta absorvância o número de unidades formadoras de colônias, já que os *beads* de quitosana nos meios reacionais parecem ter tornado o meio reacional um pouco mais turvo, o que dificultou o estabelecimento desta relação. Wen-Tao et al. (2005) utilizaram a medida espectrofotométrica para medir a liberação de células imobilizadas em *beads* de alginato, para o meio reacional. Os dados observados na Tabela 4.6 para *Bacillus pumilus* indicam a impossibilidade de qualquer inferência espectrofotométrica do meio reacional sem a presença de um branco, tendo em vista que a medida espectrofotométrica e a contagem das unidades formadoras de colônia não se relacionaram, mesmo porque as medidas de absorvâncias entre 0,200 e 1,00 de *Bacillus pumilus* ficam em torno de 10^7 e 10^8 UFC/mL, respectivamente.

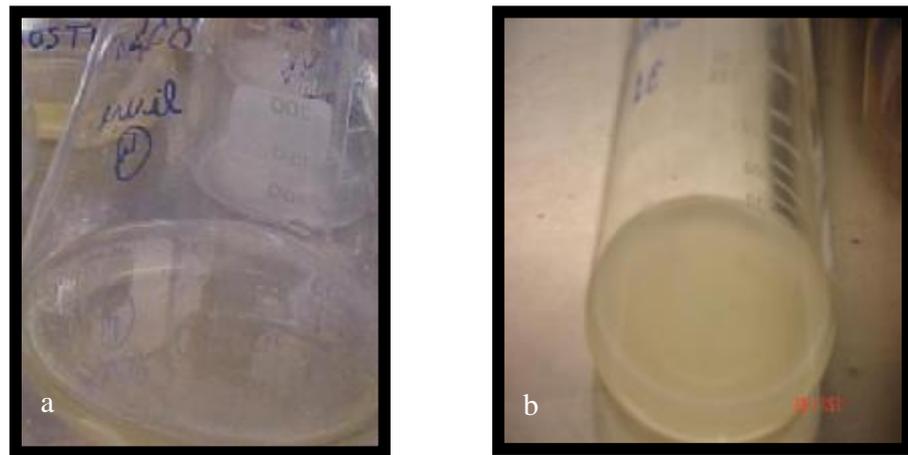


Figura 4.12: Aspecto da Biodegradação com Células Livres de *B. pumilus* nos Tempos: a) Zero e b) Após Seis Dias de Incubação a 160 rpm, a 25° C.



Figura 4.13: Aspecto da Biodegradação com Células de *B. pumilus* Imobilizadas em Quitosana nos Tempos: a) Zero e b) Após Seis Dias de Incubação a 160 rpm, a 25° C.

O número de unidades formadoras de colônia aumentou para o experimento com células livres de 10^7 (inicial) para 10^8 UFC/mL com 48 horas de cultivo, permanecendo em torno desta quantificação durante todo o ensaio de biodegradação até 144 horas, quando declinou para 10^7 UFC/mL. Esta fase de declínio coincidiu com o percentual de 98,35 % de biodegradação do n-Hexadecano (Tabela 4.7). Sendo assim, conclui-se que esta queda deveu-se ao fato de que a fonte de carbono havia se esgotado.

Tabela 4.7: Percentual de Biodegradação de n-Hexadecano por *B. pumilus* na Forma Livre e Imobilizada.

Tempo (h)	Percentual Residual (%)	Percentual de Biodegradação (%)
Bactéria Livre		
0	100	0
48	18,17	81,83
96	13,72	86,28
144	1,65	98,35
Bactéria Imobilizada		
0	100	
48	61,88	38,12
96	15,47	84,53
144	9,21	90,79

Com relação ao número de unidades formadoras de colônias nos *beads* (expressos em UFC/g), observou-se que houve perdas durante o processamento das esferas, mas que também houve uma recuperação do crescimento celular permanecendo com uma densidade de 10^7 UFC/g até o final dos experimentos. A degradação de 1% n-Hexadecano chegou a 90,79% com 144 horas de cultivo. Não houve diferença significativa entre os percentuais de biodegradação de Hexadecano por células livres ou imobilizadas de *B. pumillus* após 144h de incubação.

Nota-se, nas Tabelas 4.5 e 4.6, que os valores de pH para as células livres sofreram maiores variações (de 6.88 a 7.78) do que com células imobilizadas (de 7,24 a 7.39), o que não era o esperado, tendo em vista que as condições experimentais a que os beads foram submetidos (submersos em NaOH pH 14), acreditava-se que os resíduos deste NaOH, ou os resíduos da quitosana poderiam afetar o pH. Entretanto estes valores não ultrapassaram em muito a faixa da neutralidade em nenhum dos experimentos, sendo a média em torno de $7,34 \pm 0,06$ para as células imobilizadas e de $7,57 \pm 0,04$ para células livres. Resultado semelhante foi encontrado por Lima (2005), estudando a degradação de *orto-meta* e *para-xileno* por *B. megaterium*.

A concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) aumentou significativamente com o crescimento da biomassa nos experimentos com células livres, e se estabilizando a partir de 48h de cultivo (Tabela 4.5). Segundo Banat (1994) e Mulligan (2005), o biossurfactante produzido por espécies de *B. pumilus* é um lipopeptídeo (surfactina), e como os biossurfactantes são metabólitos secundários sua produção máxima ocorre na fase estacionária de crescimento (VASILEVA-TONKOVA & GESHEVA, 2005). Pode-se inferir que este aumento na concentração protéica, justamente quando o número de células permaneceu constante, deve-se ao fato de haver produção de pequenas quantidades deste biossurfactante nestas condições de frascos agitados, embora não tenha sido possível sua confirmação através de ensaios de emulsificação.

Nas culturas com as células imobilizadas a concentração de proteínas foi bem baixa, embora tenha havido um aumento significativo com 48 h, e depois tenha caído para a metade (Tabela 4.6). Pode-se especular que a quitosana pudesse estar quelando as proteínas produzidas dada a sua capacidade de se ligar a moléculas carregadas negativamente como proteínas, polissacarídeos, ácidos graxos, vitaminas e sais minerais, devido à presença, em sua

molécula de grupamentos aminos livres (LEE et al., 2001; BASSI & PRASHER, 2000; GUIBAL, 2004), diminuindo assim sua concentração nos sobrenadantes.

A concentração de carboidratos inicial nas amostras dos sobrenadantes do experimento com células livres foi bem maior, provavelmente proveniente de resíduos do inóculo em meio de TSB (proveniente do inóculo) e foi decrescendo à medida que a densidade celular foi aumentando, mostrando que nenhum biossurfactante de natureza polissacarídica foi eliminado no meio (Tabela 4.5). Para as células imobilizadas não havia resíduo inicial, pois as células foram centrifugadas e lavadas, entretanto a concentração de carboidratos foi consideravelmente mais alta do que com as células livres, provavelmente devido a contribuições dos grupamentos glucosamínicos da quitosana (Tabela 4.6).

Diferentemente do apresentado nos ensaios em tubos (Figura 4.8), em nenhum dos ensaios em frascos agitados a bactéria promoveu a emulsificação de querosene no teste de E24 (Tabela 4.5 e 4.6). Acredita-se que a emulsificação detectada nos testes com tubos tenha sido devido à baixa transferência de oxigênio formada pela camada de óleo na parte superior dos tubos, o que não ocorre quando as células são submetidas aos experimentos em frascos agitados, seja com células livres ou imobilizadas. Fatores ambientais interferem na produção de biossurfactantes através de seu efeito no crescimento ou atividade celular (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998).

Quanto às análises cromatográficas conclui-se que o método de extração líquido-líquido utilizado nestes experimentos foi eficiente quanto a sua reprodutibilidade nas amostras, possuindo um coeficiente de variância de 5,26, o que demonstra ser um método satisfatório para as análises de n-Hexadecano.

Por comparação entre as áreas dos picos do n-Hexadecano nas amostras, controle e experimentais (Anexo), foi calculado o percentual residual e, conseqüentemente o percentual de biodegradação (Tabela 4.7). Para isto, considerou-se a área do pico controle como tendo a concentração máxima (100%). Os referidos valores foram provenientes da média aritmética obtida das duplicatas.

Tanto nos experimentos com células de *B. pumilus* livres como com imobilizadas em gel com 4 % de quitosana (GD 78%) o n-Hexadecano foi reduzido a percentuais muito inferiores aos de seus controles para cada dois dias de experimento. Para as células aprisionadas esta redução do hidrocarboneto foi mais gradual, acredita-se que estas diferenças tenham decorrido de perdas do número de células provenientes do processamento das esferas

e também devido às taxas de transferência deste hidrocarboneto para o interior das esferas, onde existe a maior densidade celular, sendo esta redução de 38,12 % com 48 horas de experimento, enquanto que para células livres foi de 81,83 % no mesmo tempo. Com 96 horas de cultivo e ao final de 144 horas de experimento quando esta diferença no número de células e os problemas difusionais ocasionados pelo suporte foram menores, as taxas de biodegradação foram similares, sendo respectivamente de 84,53 % e 90,79 % para células imobilizadas, e de 86,28 % e 98,35 % para células livres.

Koma et al. (2001) estudando a biodegradação de n-alcanos de cadeia longa por *Acinetobacter sp.*, obtiveram uma taxa de biodegradação de 93,8 % com 48 horas de cultivo em n-Hexadecano a 0,1 %, entretanto estes autores não especificam seu inóculo inicial, nem a rotação, não podendo se fazer uma comparação dos resultados de biodegradação. Entretanto eles observaram que este microrganismo produziu 1-Hexadecanol e ácido 1-hexadecanóico, quando crescia em n-Hexadecano, o que indica que os alcanos de cadeia longa foram metabolizados pela via de oxidação terminal de n-alcanos, sendo catabolizado pelas monoxigenases que renderam os álcoois primários, os quais foram oxidados aos seus aldeídos correspondentes e então aos seus ácido graxos correspondentes pela ação das aldeído desidrogenases.

Kim et al. (2002), estudando *Rhodococcus erythropolis* (S +14He), verificaram que estes microrganismos não apenas capturavam seletivamente n-Hexadecano entre uma mistura de hidrocarbonetos, como também os acumulavam em inclusões celulares ou sob a forma de ácido hexadecanóico nas membranas celulares.

Analisando os cromatogramas (Anexo) em estudo e os relacionando com os resultados descritos acima, pode-se especular que o mecanismo desta linhagem de *B. pumillus* para degradação de n-Hexadecano seja sua total mineralização a CO₂ e H₂O, ou sua persistência em inclusões celulares, ou na sua membranas celular, tendo em vista que não apareceram, compostos de pesos moleculares menores nos cromatogramas.

Puntus et al. (2005), estudando bactérias do gênero *Bulkholderia* e *Pseudomonas* por ressonância magnética nuclear, observaram que as linhagens que produziam biossurfactantes excretáveis, revelaram acumular metabólitos no meio que foram identificados como: formiato, acetato, succinato, β-alanina, β-hidroxitirato, trealose, e ácidos graxos. Sendo que a presença de succinato e acetato indicam que existe uma relação entre seu metabolismo e o Ciclo de Krebs e Ciclo do Acetil-CoA.

Kaya & Picard (1996) utilizaram gel de quitosana para aprisionar células viáveis de uma microalga (*Scenedesmus bicellularis*) para a remoção de fósforo e nitrogênio de águas residuais urbanas e obtiveram um rendimento de 95 % de remoção de NH_4^+ -N.

Jianlong & Yi (1998) degradaram 200 mg/L de 4-cloro-fenol em 90 horas usando gel de quitosana mais carragenana, e concluíram que o aumento da concentração para 250 mg/L não afetou o tempo da biodegradação para as células imobilizadas, como para as células livres. Eles atribuíram este efeito provavelmente a alta densidade celular dentro das esferas ou ao fato da imobilização prover uma estabilidade catalítica à toxicidade deste composto. Entretanto, como estes autores utilizaram concentrações celulares iniciais diferentes para os dois experimentos, esta conclusão pode realmente estar mais relacionada com a primeira hipótese.

Ionata et al. (2005) utilizaram células de *Arthrobacter sp.* imobilizadas em uma matriz porosa de poliestireno para degradar pentanos e obtiveram uma bioconversão deste hidrocarbonetos de 95 %, sendo mantida em torno de 85-95 % durante dois meses, com ciclos de 36 horas em biorreator.

A quitosana por si só pode ser utilizada para a remoção de poluentes. Chung et al. (2005) utilizaram quitosanas de pesos moleculares diferentes para a remoção de compostos orgânicos, compostos inorgânicos e bactérias de águas residuais da criação de peixe e concluíram que as quitosanas de alto peso molecular foram melhores para a remoção da turbidez, sólidos suspensos, em contraste quitosanas com baixo peso molecular removeram mais eficientemente NH_3 e PO_4^{3-} .

4.8 – Microscopia Eletrônica de Varredura

Devido à seleção da bactéria *B. pumilus* para os ensaios de biodegradação com células livres e imobilizadas, a MEV somente foi utilizada para esta linhagem, tendo em vista que seria necessário o conhecimento de sua ultraestrutura a fim de facilitar sua visualização nas esferas de quitosana. Na Figura 4.14, pode-se observar a morfologia em ultra-estrutura da bactéria *B. pumilus* em sua forma livre, note que seu comprimento e diâmetro estão em torno de $1\mu\text{m}$ e $0,7\mu\text{m}$, respectivamente, o que está de acordo com Manual de Bergey (HOLT et

al., 1994), e esta característica ajuda, também, a distingui-lo de *B. megaterium*, que possui diâmetro acima de 1 μm .

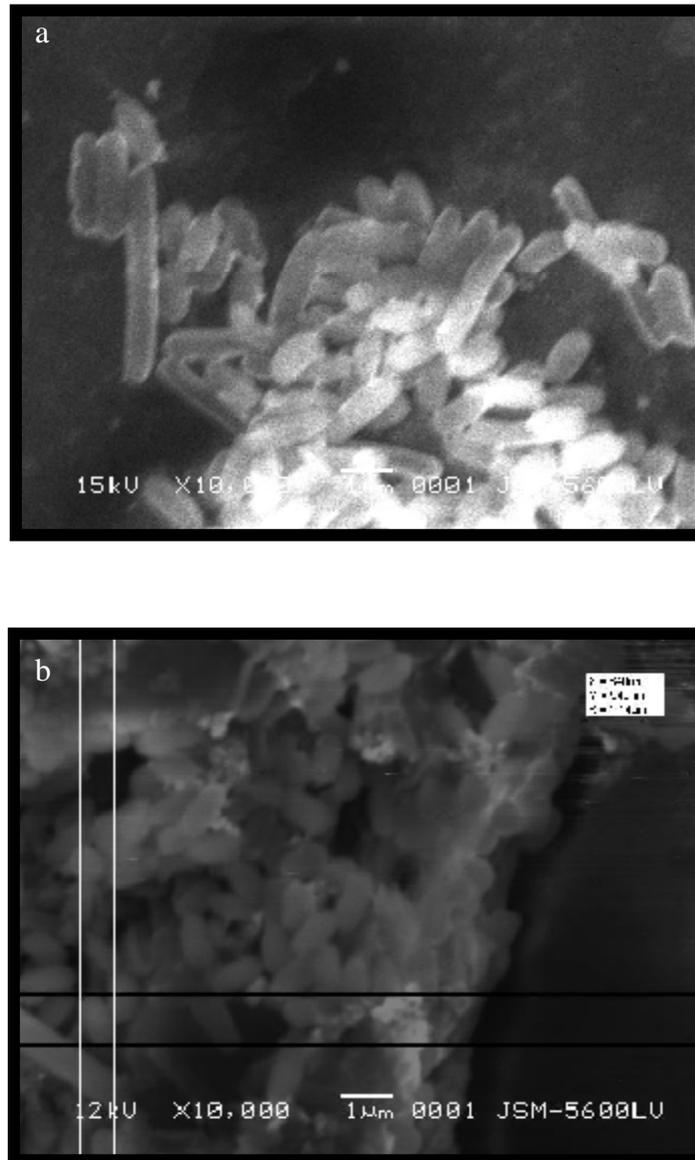


Figura 4.14: Aspecto Geral da Ultraestrutura de *Bacillus pumilus* na Forma Livre (a, b).

Madihally & Mathew (1999) demonstraram que soluções mais concentradas de quitosana produziam poros menores e também que a temperatura de congelamento, antes da liofilização, influenciava também nos tamanhos destes poros. A concentração de 4 % de quitosana foi considerada por estes autores, como uma concentração boa para a produção de

beads com poros bastante pequenos, se bem que a metodologia de secagem destas esferas pode interferir no tamanho dos poros, bem como na sua ultraestrutura.

Os resultados da análise ultraestrutural das amostras submetidas à secagem em estufa a 35 °C, estão apresentados na Figura 4.15 e Figura 4.16, onde pode-se visualizar a esferas controle (sem bactérias) intactas (Figura 4.15 A1-A2), a análise destas micrografias revela esferas com superfície homogênea, densidade eletrônica moderada e granulosa e quando seccionadas, percebe-se uma face interna estriada longitudinalmente partidas ao meio (Figura 4.15 A3-A4). Esferas com células de *Bacillus pumilus* também secas em estufa a 35 °C estão apresentadas na Figura 4.16 (A1-A3), onde em A3 observa-se que as células de *B. pumilus* que se apresentam aderidas à superfície das esferas é e revelada, sob a forma de grumos dispersos. Observa-se que os *beads* secos desta forma apresentaram uma ultraestrutura bastante homogênea, o que favorece sua utilização, pois é uma metodologia barata e eficiente de secagem das esferas, não necessita de liofilizador e nem nitrogênio líquido, sendo ainda realizada a 35 °C, temperatura comum no Nordeste do Brasil e em estufas de secagem.

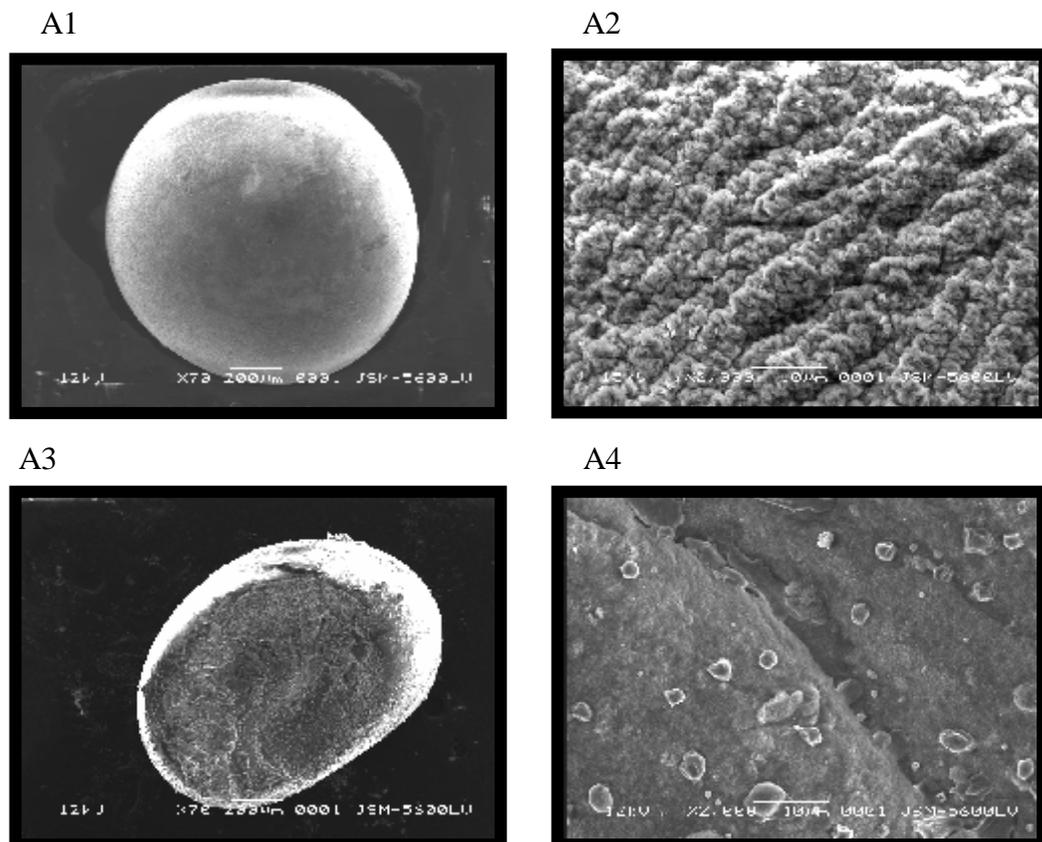


Figura 4.15: Eletromicrografias de Esferas Submetidas à Secagem em Estufa a 35 °C A1- Esfera Controle Intacta; A2 idem A1; A3 – Esfera Seccionada; A4 idem A3.

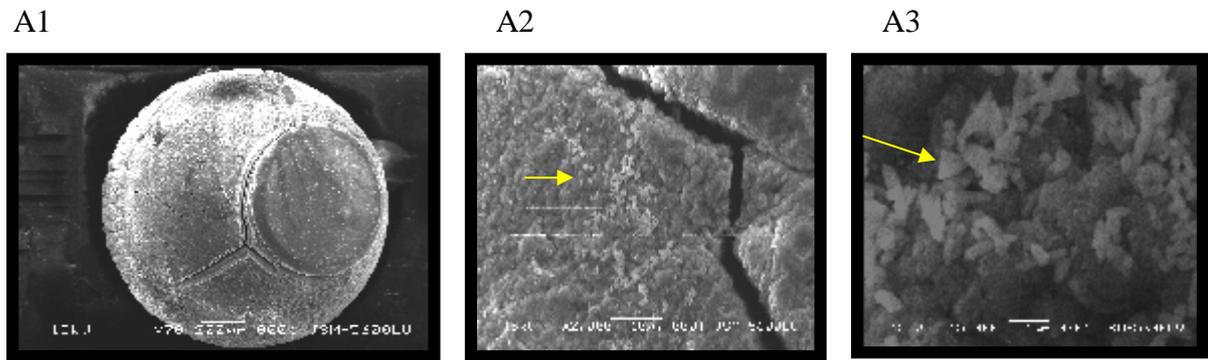


Figura 4.16: Eletromicrografias de Esferas com *Bacillus pumilus* Submetidas à Secagem em Estufa a 35 °C. A1- Esfera Intacta; A2 e A3 idem a A1.

As micrografias obtidas com a análise das amostras submetidas à liofilização, após congelamento a -20 °C, estão apresentadas na Figuras 4.17 (*beads* intactos) e Figura 4.18 (*beads* seccionados). A observação das amostras permite a visualização de variações na homogeneidade das esferas, bem como na sua superfície interna e externa. Uma superfície menos regular e com maior densidade eletrônica é percebida. Esferas menos globosas são observadas. A superfície das esferas controle intactas (Figura 4.17 A1 e A2). Nas Figuras 4.17 B1-B4 e 4.18 A1-A4 apresenta-se altamente granular, não sendo possível a visualização da presença de células de *B. pumilus*. Um padrão altamente reticulado, homogêneo e poroso é visualizado na face interna da esfera seccionada (Figura 4.18 A1-A4). Segundo Madihally & Mathew (1999) temperaturas de congelamento entre - 5 °C e - 15 °C influenciam muito mais no tamanho dos poros do que em temperatura entre - 15 °C e - 196 °C. Observa-se nestes *beads* que temperaturas de congelamento a - 20 °C, exibiram poros na superfície, sugerindo que a nucleação ocorreu externamente ao gel e a formação de cristais de gelo serviram para colapsar e fundir a estrutura fibrosa do gel.

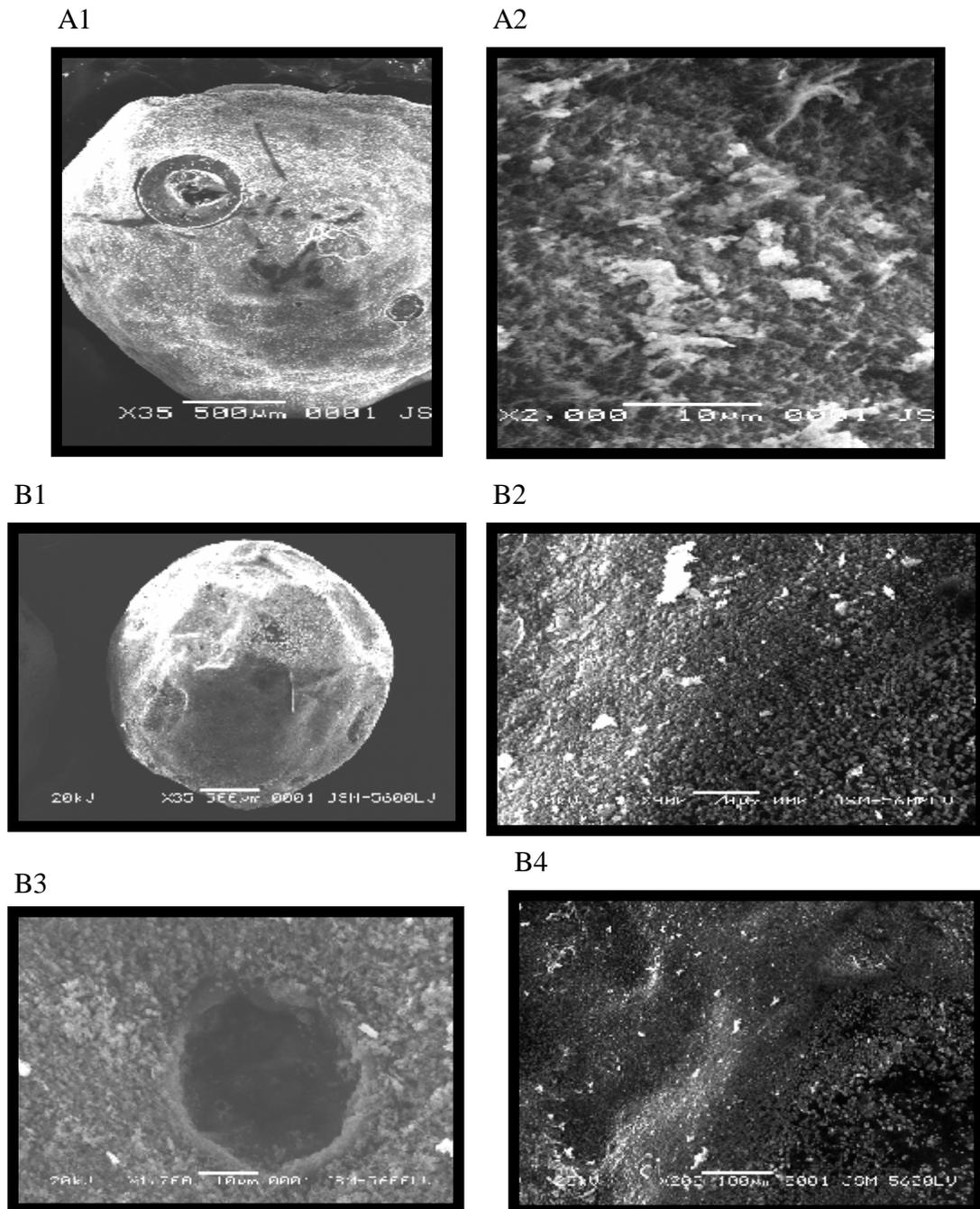


Figura 4.17: Eletromicrografias de Esferas Submetidas à Liofilização, Após Congelamento em Nitrogênio Líquido, A1- Esfera Controle Intacta; A2 idem A1. B1- Esfera com Bactérias, Intacta; B2, B3 e B4 idem B1.

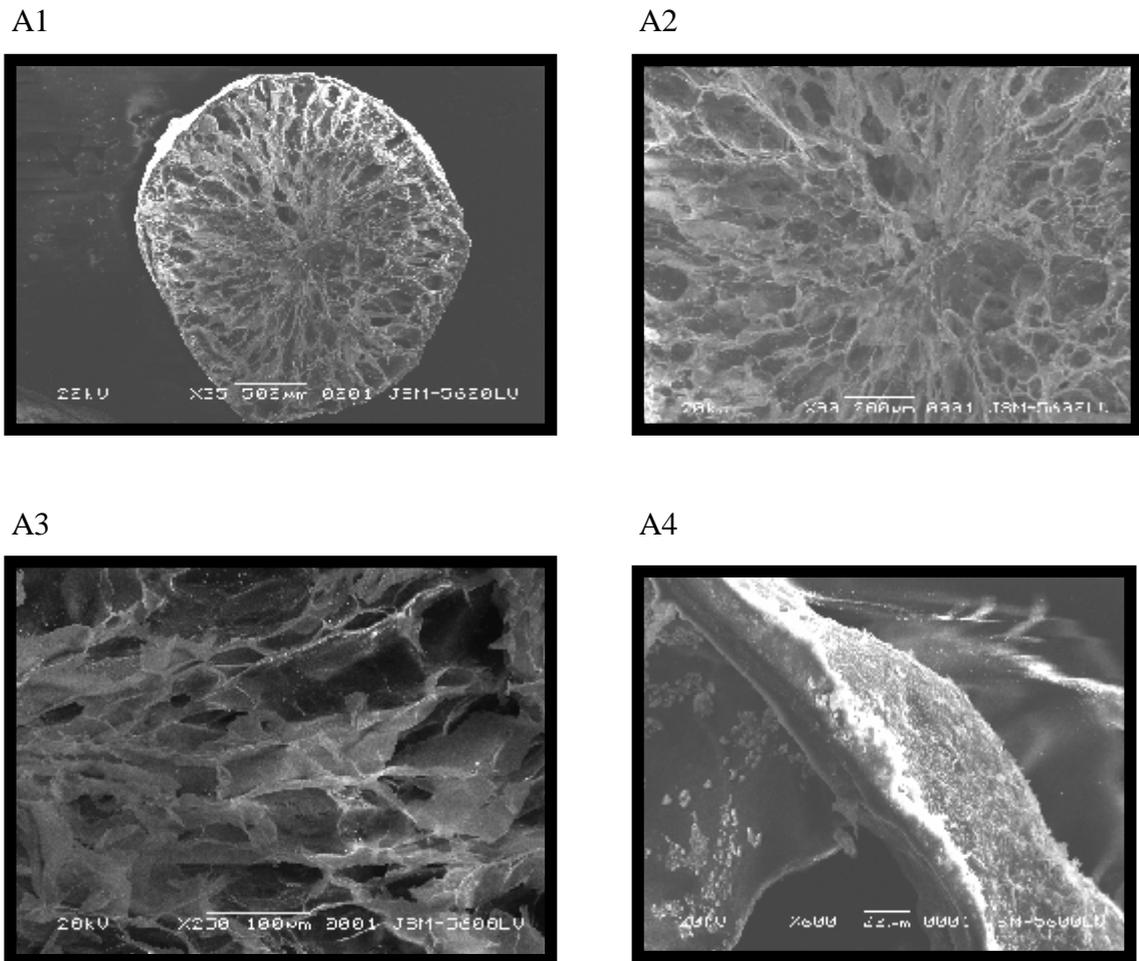


Figura 4.18 : Eletromicrografias de Esferas Submetidas à Liofilização, Após Congelamento a -20 °C. A1- Esfera Incubada com Bactérias, Seccionada; A2 , A3 e A4 idem A1.

Já as micrografias obtidas com a análise das amostras submetidas à liofilização, após congelamento em nitrogênio líquido, que estão apresentadas na Figura 4.19 A-C. Sua estrutura fibrosa sugere que o congelamento rápido em nitrogênio líquido produziu cristais de gelo muito pequenos, que não interferiram na estrutura das esferas. A observação das amostras permite a visualização de variações na homogeneidade na textura das esferas. Uma superfície altamente enrugada, fraturada e granular, porém com eletrondensidade elevada é percebida nas amostras controle (Figura 4.19 A1-A3). As esferas com células de *B. pumilus* exibem superfície heterogênea, muito mais enrugada e irregular que as esferas controle (Figura 4.19 B1-B2), e se apresentaram de forma mais dispersa nos *beads*, não como em grumos, como nas amostras secas em estufa, sendo similar a apresentação de uma “colméia” (Figura 4.19 B3-B4). Além de exibirem uma superfície granular, reticulada e altamente porosa. A face interna da esfera seccionada exhibe uma malha de microfibras semelhante a uma esponja, recoberta por uma superfície externa enrugada (Figura 4.20 A1-A4).

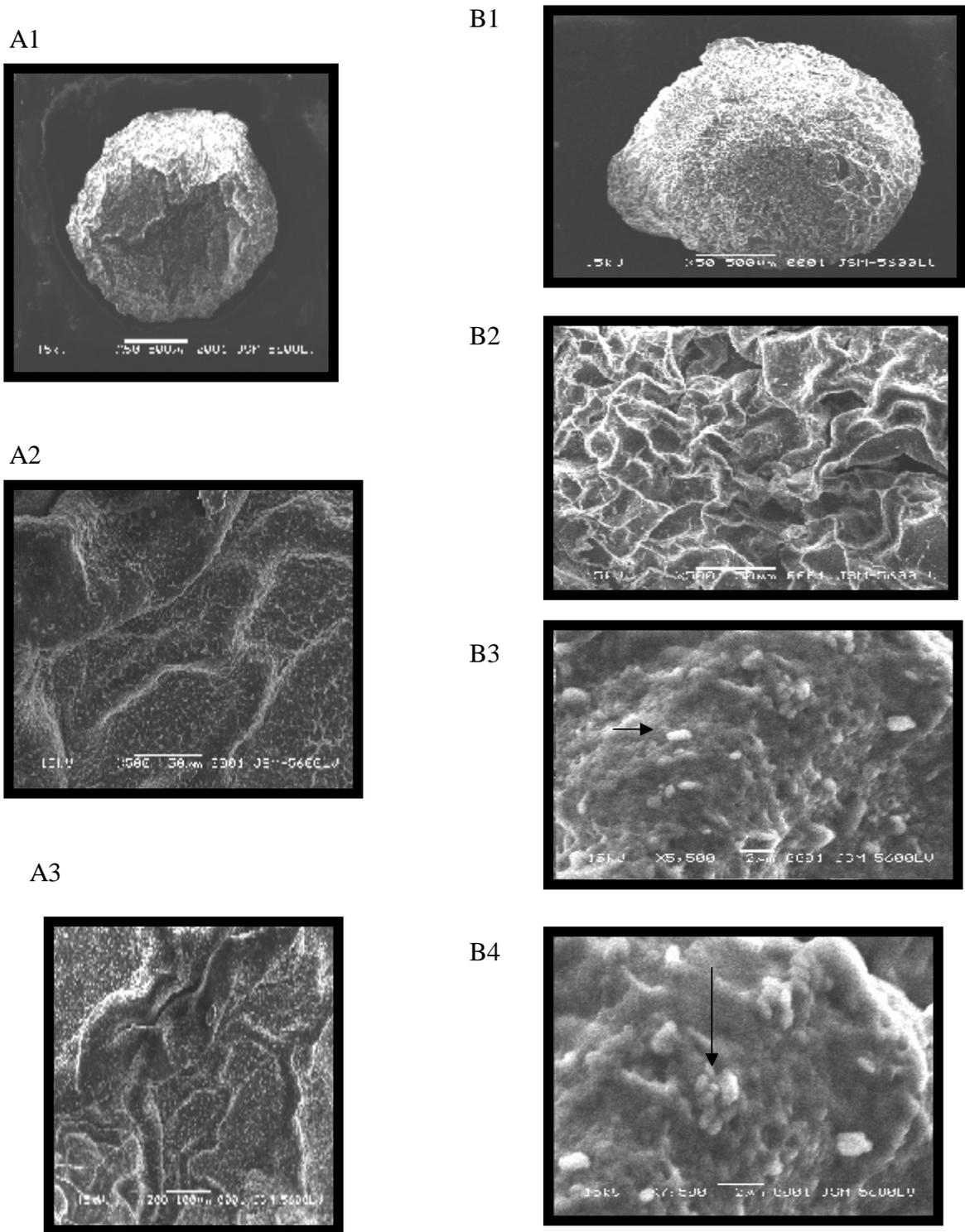


Figura 4.19: Eletromicrografias de Esferas Submetidas à Liofilização, Após Congelamento em Nitrogênio Líquido. A1- Esfera Controle Intacta; A2 e A3 idem A1; B1- Esfera Incubada com Bactérias, Intacta; B2, B3 e B4 idem B1.

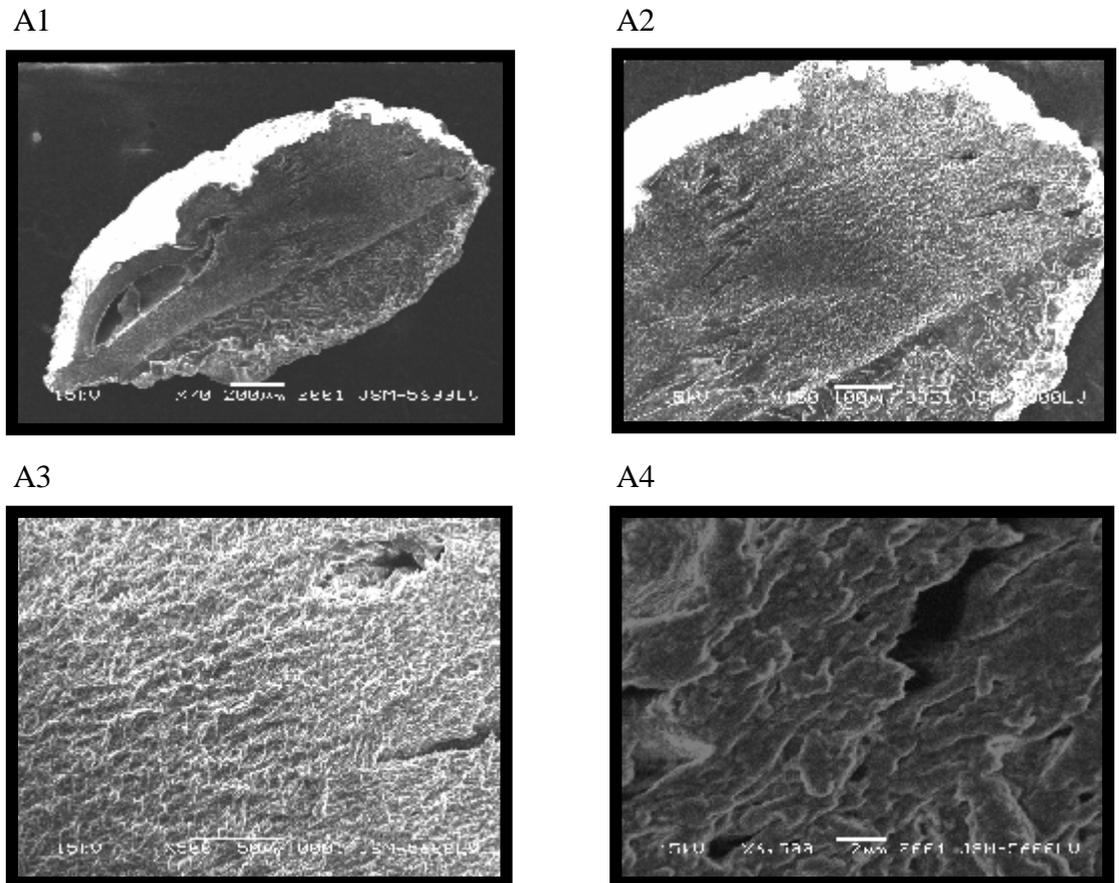


Figura 4.20: Eletromicrografias de Esferas Submetidas à Liofilização, Após Congelamento em Nitrogênio Líquido. A1- Esfera com Células de *Bacillus pumilus*, Seccionada; A2, A3 e A4 idem A1.

Sem dúvida, esferas submetidas ao processo de liofilização exibem superfície altamente diferenciada daquela observada nas amostras submetidas à secagem em estufa, caracterizando uma superfície com estrutura esponjosa. Variações na estrutura fina nas superfícies das esferas também foram observadas. Embora não tenha sido analisada a influência destes diferentes tipos de processamento de *beads* no desenvolvimento da cultura e no processo biodegradativo é razoável supor que, dada às diferenças de textura e ultraestrutura observadas, é possível especular que esse processamento possa interferir na qualidade e rendimento do produto.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 – Conclusões

Nas condições adotadas neste trabalho, os resultados obtidos permitiram concluir que:

- Das quarenta e uma linhagens bacterianas, pertencentes à Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE, duas foram selecionadas como melhores degradadores de n-Hexadecano, sendo identificadas como *Bacillus pumilus* UFPEDA 831 e *Ochrobactrum anthropi* UFPEDA 840.
- Ambas as linhagens selecionadas cresceram melhor em concentrações de 1 a 5 % de n-Hexadecano, embora tenham sido capazes de crescer em até 15 % desse hidrocarboneto.
- As bactérias selecionadas não demonstraram adesão a fase oleosa (1 a 20 % de n-Hexadecano) e produziram emulsificação acima de 50 %, porém somente a bactéria *B. pumilus* apresentou halos de hemólise, o que é um indicativo da produção de biossurfactante.
- Embora nenhuma das linhagens selecionadas tenha demonstrado produzir quitosanase, apenas a bactéria *B. pumilus* apresentou resistência a soluções de quitosana (GD 78%) de até 4 %, sendo selecionada para a imobilização neste suporte.
- A bactéria *B. pumilus* apresentou características desejáveis para aplicações ambientais, tais como: resistência a uma ampla faixa de pH (5-11), temperatura (16-50 °C), concentração de NaCl (> 10 %), irradiação UV (8 minutos) e sensibilidade a vários antibióticos.
- A bactéria *O. anthropi* foi sensível a quitosana, além de ser resistente a maioria dos antibióticos testados.
- Desenvolveu-se uma metodologia de imobilização de células viáveis de *B. pumilus* em gel de quitosana a 4 %. As esferas (*beads*) produzidas foram uniformes e estáveis sob agitação de 160 rpm durante seis dias.
- As células aprisionadas nestes *beads* não só permaneceram estáveis, como também demonstraram ser capazes de crescer em n-Hexadecano, como única fonte de carbono.
- Experimentos de biodegradação em 1 % de n-Hexadecano realizados com células de *B. pumilus* livres e imobilizadas apresentaram uma degradação, em seis dias, de cerca de 98,4 % e 90,8 %, respectivamente.
- A microscopia eletrônica de varredura revelou que as diferentes formas de secagem dos *beads* resultaram em ultraestruturas diferenciadas. Além disso, as bactérias se

apresentaram sob a forma de grumos em amostras secas em estufa a 35 °C e mais dispersas quando estes *beads* foram liofilizados.

Portanto, este trabalho descreve de forma inédita a produção de *beads* de quitosana com *B. pumilus* imobilizado para a degradação de n-Hexadecano. Os testes realizados com esse produto provaram sua eficácia e resistência para este tipo de ensaio, confirmando o seu potencial para aplicações em processos de biorremediação.

5.2 – Sugestões

- Testar a biodegradação de compostos recalcitrantes com bactéria *Bacillus pumilus* na forma livre e imobilizada em quitosana.
- Testar a utilização deste sistema com células imobilizadas em quitosana para a degradação de outros compostos.
- Testar a rehidratação dos *beads* e subsequente utilização em biodegradação.
- Testar a viabilidade das células no interior dos *beads* após a secagem em estufa a 35°C.
- Testar a reutilização dos *beads* úmidos e secos e verificar sua eficiência ao longo dos ciclos.
- Verificar a eficiência da biodegradação de n-Hexadecano em amostras de solo e de mar, com a bactéria *B. pumilus* na forma livre e imobilizada em quitosana.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. (1999a). Effect of Chemical Structures on Biodegradation. In: _____ *Biodegradation and Bioremediation*. 2 ed. New York: Academic Press, Cap.11, p.177-194.

ALEXANDER, M. (1999b). Environmental Effects. In: _____ *Biodegradation and Bioremediation*. 2 ed. New York: Academic Press, Cap.14, p.269-298.

ALSARRA, I. A.; NEAU, S. H.; HOWARD, M. A. (2004). Effects of Preparative Parameters on The Properties of Chitosan Hydrogel Beads Containing *Candida rugosa* Lipase. *Biomaterials*. v. 25, p. 2645-2655.

ALVAREZ, H. M. (2003). Relationship Between β -Oxidation Pathway and The Hydrocarbon-Degrading Profile in *Actinomyces* Bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*. v.52, p.35-42.

ATLAS, R. M. (1981a) Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective. *Microbial Reviews*. v. 45(1), p. 180-209.

ATLAS, R. M. (1981b). Fate Oil From Two Major Oil Spills: Role of Microbial Degradation in Removing Oil From The AMOCO Cadiz and IXTOC I Spills. *Environmental International*. v. 5, p. 33-38.

ATLAS, R.M. *Petroleum Microbiology* (1984). New York. Macmillian Publishing Company.

ATLAS, R.M. (1995a). Bioremediation of Petroleum Polluants. *International Biodeterioration & Biodegradation*. p. 317-327.

ATLAS, R. M. (1995b). Petroleum Biodegradation and Oil Spill Bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*. v.31, n^o 4-12, p. 178-182.

ATLAS, R.M. (1995c). *Handbook of Media for Environmental Microbiology*. New York: CRC Press, p.81,489,491.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. (1972). *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. Menio Park, Califórnia. Benjamin Cumins Publishing Company.

BADAWY, M.E.I.; RABEA, E.;I.; ROGGE, T.M.; STEVENS, C. V.; STEURBAUT, W.; HÖFTE, M.; SMAGGHE, G. (2005). Fungicidal and inseticidal activity of θ -acyl chitosan derivates. *Polymer Bulletin*. v. 54, p. 279-289.

BAKER, K. H & HERSON, R. (1994). *Bioremediation*. New York. McGraw-Hill, inc. 375p.

BAILEY, J. E. & ALLIS, D. F.(1986). *Biochemical Enngineering Fundamentals*. 2nd. ed. New York: McGrawl-Hill. p.156-189.

BANAT, I.M. (1993). The Isolation of a Thermophilic Biosurfactant Producing *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*. v. 15, p. 591-594.

- BANAT, I.M. (1994). Biosurfactantes Production and Possible Uses in Microbial Enhanced Oil Recovery and Oil Pollution Remediation: a Review. *Bioresource Technology* v. 51, p. 1-12.
- BARATHI, S. & VASUDEVAN, N. (2001). Utilization of Petroleum Hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* Isolated From PETROLEUM Contaminated Soil. *Environment International*. v. 26, p. 413-416.
- BARBIERI, S. M. (1998). Biodegradação de Compostos Aromáticos. In: MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúma: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Cap. 10, p. 211-242.
- BARTHA, R. (1996). Biotechnology of Petroleum Pollutant Biodegradation. *Microbial Ecology*. v. 12, p. 155-172.
- BASSI, R. & PRASHER, S. O. (2000). Removal of Selected Metal Ions From Aqueous Solutions Using Chitosan Flakes. *Separation Science and Technology*. v. 35, n. 4, p. 547-560.
- BAUER, A.W.; KIRBY W.M.M.; SERRIS, J.C.; TURCK, M. (1966). Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disc Method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45: 493-496.
- BICKERSTAFF, G. F. (1997). Immobilization of Enzymes and Cells. In: SHUMAUDER, H.P., *Methods in Biotechnology*, Totowa: Humana press, v. 1, p 1-11.
- BRADFORD, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein-Dye-Binding. *Anal Biochemistry*. v. 72, p. 248-254.
- CALVO, C.; TOLEDO, F. L.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. (2004). Surfactant Activity of Naphtalene Degrading *Bacillus pumilus* Strain Isolated From Oil Sludge. *Journal of Biotechnology*. v. 109, p. 255-262.
- CAMEOTRA, S. S. & MAKKAR, R. S. (1998). Synthesis of Biosurfactants in Extreme Conditions. *Applied Microbiology Biotechnology*. v. 50, p. 520-529.
- CASSIDY, M. B.; LEE, H.; TREVORS, J.T. (1996). Environmental Applications of Immobilized Microbial Cells: a Review. *Journal of Industrial Microbiology*. v. 16, p. 79-101.
- CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. (2001). Influence of The Degree of Acetylation on Some Biological Properties of Chitosan Films. *Biomaterials*. v. 22, p.261-268.
- CHEN, Y.M.; CHUNG, Y.C; WANG, L.W.; CHEN, K. T.; LI, S.Y. (2002). Antibacterial Properties of Chitosan in Waterborne Pathogen. *Journal of Environmental Science and Health*. v. A37, n.7, p. 1379-1390.
- CHÉNIER, M.R.; BEAUMIER, D. ROY, RÉAL, DRISCOLL, B.T.; LAWRENCE, J.R.; GREER, C.W. (2003). Impact of Seasonal Variations and Nutrient Inputs on Nitrogen

Cycling and Degradation of Hexadecane by Replicated River Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 69(9), p. 5170-5177.

CHEVALIER, P. & NOUE, J. de La (1985). Wastewater Nutrient Removal with Microalgae Immobilized in Carrageenan. *Enzyme Microbiology Technology*. v. 7, p. 621-624.

CHUNG, Y-C.; LI, Y-H.; CHEN, C-C. (2005). Pollutant Removal From Aquaculture Wastewater Using the Biopolymer Chitosan at Different Molecular Weights. *Journal of Environmental Science and Health*. v. 40, p. 1775-1790

COOPER, D.G. & GOLDENBERG, B. G. (1987). Surface-Active Agents From Two *Bacillus* Species. *Applied Environmental Microbiology*. v. 53, p. 224-229.

CORSEUIL, H. X.; HUNT, R.S.; SANTOS, R.C.F. (1997). The Influence of The Gasoline Oxygenates Ethanol on Aerobic and Anaerobic BTEX Biodegradation. *Water Research*. v. 32, p. 2065-2072.

CUNNINGHAM, C.J.; IVSHINA, I.B.; LOZINSKY, V.I.; KUYUKINA, M.S.; PHILP, J.C. (2004). Bioremediation of Diesel-Contaminated Soil by Microorganisms Immobilized in Polyvinyl Alcohol. *International Biodeterioration & Biodegradation* v. 54, p. 167-174.

DEL'ARCO, J. P. & de FRANÇA, J.P. (2001). Influence of Oil Contamination Level on Hydrocarbon Biodegradation in Sandy Sediment. *Environmental Pollution*. v.110, p. 515-519.

DESAI, J.D. & BANAT, I. M. (1997). Microbial Production of Surfactants and The Commercial Potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 61, n-1, p. 47-64.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. SIMTH, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chemistry*. v. 28, p. 35356.

DUTTA, P. K.; RAVIKUMAR, M.N.V.; DUTTA, J. (2002). Chitin and chitosan for versatile applications. *Journal of Macromolecular Science*. v. C42, n. 3, p. 307-354.

EL-SAYED, W.; IBRAHIM, M. K.; ABU-SHADY, M.; EL-BEIH, F.; OHMURA, N.; SAIKI, H.; ANDO, A. (2003). Isolation and Identification of a Novel Strain of The Genus *Ochrobactrum* with Phenol-Degrading Activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v. 96, n. 3, p. 310-312.

ENCINAS, J. P.; SANZ-GOMES, J.; GARCIA-LOPEZ, M. L.; GARCIA-ARMESTO, M. R.; OTERO, A. (1996). Evaluation of Different Systems for Identification of *Bacillus* strains Isolated from Spanish Fermented Sausages. *Meat Science*. v. 42, p. 127-131.

FRANKENBERGER Jr., W.T. (1992). The Need For a Laboratory Feasibility Study in Bioremediation of Petroleum hydrocarbons. In: *Hydrocarbons Contaminated Soils and Groundwater*. Boca Raton. E.J.; Calabrese and P.T. Kostecki eds. p. 237-293.

GESTEL, K. V.; MERGAERT, J.; SWINGS, J.; COOSEMANS, J. RYCKEBOER, J. (2003). Bioremediation of Diesel Oil-Contaminated Soil by Composting With Biowaste. *Environmental Pollution*. v. 125, p. 361-368.

GOMES, E. B. (2004). *Biodegradabilidade de Querosene de Aviação Movimentado pelo Terminal Portuário de Suape-PE*. 109f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

GOUVEIA, E. R.; LIMA, D. P. A.; DUARTE, M. S.; LIMA, G. M. S.; ARAUJO, J. M. (2003). Bactérias Produtoras de Biossurfactantes. *Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. v. 39, p. 39-45.

GUIBAL, E. (2004). Interactions of Metal Ions With Chitosan-Based Sorbents: a Review. *Separation and Purification*. v. 38, p. 43-74.

GUIBAL, E.; VINCENT, T.; SPINELLI, S. (2005). Environmental of Chitosan-Supported Catalysts: Catalytic Hollows Fibers for the Degradation of Phenolic Derivates. *Separation Science and Technology*. v. 40, p. 633-657.

GUO, T-Y.; XIA, Y-Q.; WANG, J.; SONG, M-D.; ZHNAG, B-H. (2005). Chitosan Beads as Molecularly Imprinted Polymer Matrix for Selective Separation of Proteins. *Biomaterials*. v. 26, p. 5737-5745

HIGGINS, C. S.; AVISON, M. B.; JAMIESON, L.; SIMM, A. M.; BENNETT, P. M.; WALSH, T. R. (2001). Characterization, Cloning and Sequence Analysis of the Inducible *Ochrobactrum anthropi* AmpC β -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 47, p. 745-754.

HOLDEN, P.A.; MONTAGNE, M.G.; BRUCE, A.K.MILLER, W.G.; LINDOW, S.E. (2002). Assessing the Role of *Pseudomonas aeruginosa* Surface Active Gene Expression in Hexadecane Biodegradation in Sand. *Applied and Environmental Microbiology*. v.68(5), p. 2509-2518.

HOLMES, B.; POPOFF, M.; KIREDJIAN M.; KERSTERS K. (1988). *Ochrobactrum anthropi* Gen. nov., sp. nov. from Human Clinical Specimens and Previously Known as Group Vd. *International Journal Systematic Bacteriology*. v. 38, p. 406–416 .

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STANLEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9 ed., Baltimore: Williams & Wilkins. 787 p.

HYNE, N.J. (1995). The Nature of Oil and Gas. In: ___ *Nontechnical Guide to Petroleum Geology, Exploration , Drilling and Production*. PennWell Publishing Company. Oklahoma. p. 11-23.

IONATA, E.; BLASIO, P.; CARA, F. (2005). Microbiological Degradation of Pentane by Immobilized Cells of *Achromobacter* sp. *Biodegradation*. v. 16, p. 1-9.

- IQBAL, S.; KHALID, Z. M.; MALIK, K. A. (1995). Enhanced Biodegradation and Emulsification of Crude Oil and Hyperproduction of Biosurfactants by Gamma Ray-Induced mutant *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters Applied Microbiology*.v. 21, p. 176-179.
- IVANOVA, E. P.; VYSOTSKII, M. V.; SVETASHEV, V. I.; NEDASHKOVSKAYA, O. I.; GORSHKOVA, N. M.; MIKHAILOV, V. V.; YUMOTO, N.; SHIGERI, Y.; TAGUCHI, T.; YOSHIKAWA, S. (1999). Characterization of *Bacillus* Strains of Marine Origin. *International Microbiology*. v. 2, p. 267-271.
- JAMEELA, S. R. & JAYAKRISHNAN. (1995). Glutaraldehyde Cross-Linked Chitosan Microspheres as Long Acting Biodegradable Drug Delivery Vehicle: Studies on the *In Vitro* Degradation of Microspheres in Rat Muscle. *Biomaterials*. v. 16, p. 759-775.
- JIANLONG, W. & YI, Q. (1999). Microbial Degradation of 4-chlorophenol by Microorganisms Entrapped in Carrageenan-Chitosan Gels. *Chemosphere*. v. 38 (13), p. 3109-3117.
- JOBIN, G.; GRONDIN, G.; COUNTURE, G.; BEAULIEU, C. (2005). Microscopic Examination of Chitosan-Polyphosphate *Beads* with Entrapped Spores of The Biocontrol Agent *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76. *Microscopy and Microanalysis*. v. 11, p. 154-165.
- KAYA, V. M. & PICARD, G. (1996). Stability of Chitosan Gel as Entrapment Matrix of Viable *Scenedesmus bicellularis* Cells Immobilized on Screens for Tertiary Treatment of Wastewater. *Bioresource Technology*. v. 56, p. 147-155.
- KENNEDY, J. F. e CABRAL, J.M.S. (1987). Enzyme Immobilization. In: KENNEDY, J.F. (Ed.) *Biotechnology*, New York: Cambridge; Basel:VCH, 1987, v. 7 *Enzyme Technology*, p. 348-404.
- KIM, I. S.; FOGTH, J. M.; GRAY, M.R. (2002). Selective Transport and Accumulation of Alkanes by *Rhodococcus erythropolis* S+14He. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 80, n. 6, p. 650-659.
- KOIDE, S.S. (1998). Chitin-Chitosan: Properties, Benefits e Risks. *Nutrition Research*. v.18, n. 6, p. 1091-1101.
- KOMA, D.; HASUMI, F.; YAMAMOTO, E.; OTHA, T.; CHUNG, S-Y.; KUBO, M. (2001). Biodegradation of Long-Chain n-Paraffins From Waste Oil of Car Engine by *Acinetobacter* sp. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v.91, n. 1, p. 94-96.
- LANG, S. (2002). Biological Amphiphiles (Microbial Biosurfactants). *Current Opinion in Colloid & Interface Science*.v.7, p.12-20.
- LAURA, D.; SOCIO, G.; FRASSANITO, R.; ROTILIO, D. (1996). Effects of Atrazine on *Ochrobactrum anthropi* Membrane Fatty Acids. *Applied and Environmental Microbiology*. v.62, n. 7, p. 2644-2646.

LEE, M-Y.; HONG, K-J.; KAJICHI, T.; YANG, JI-WON. (2005). Synthesis of Chitosan-Based Polymeric Surfactants and Their Adsorption Properties For Heavy Metals and Fatty Acids. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 36, p 152- 158.

LEE, S-T.; MI, F-L.; SHEN, Y-J.; SHYU, S-S. (2001). Equilibrium and Kinetic Studies of Cooper (II) Ion Uptake by Chitosan-Tripolyphosphate Chelating Resin. *Polymer*. v. 42, p. 1879-1892.

LIMA, L.A. (2005). *Biodegradabilidade de Isômeros de Xileno por Bactérias Isoladas do Terminal Portuário de Suape-PE*. 98f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

LIN, T.Y.; HUNG, T-H.; CHENG, T-S. J. (2005). Conjugated Linoleic Acid Production by Immobilized Cells of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus*. *Food Chemistry*. v. 92, p. 23-28.

LIU, H.; DU, Y.; WANG, X., SUN, L. (2004). Chitosan Kills Bacteria Through Cell Membrane Damage. *International Journal of Food Microbiology*. v.95, p. 147-155.

MADIHALLY, S. V. & MATHEW, H. W. T. (1999). Porous Chitosan Scaffolds For Tissue Engineering. *Biomaterials*. v. 20, p. 1133-1142.

MAIER, R. M. (2000). Microorganisms and Organics Polluants. *In: MAIER, R. M.; PEPPER, I.L. e GERBA, C.P. Environmental microbiology*. New York: Academic Press. Cap. 16, p. 363-402.

MING SO, C. & YOUNG, L.Y. (1999a). Isolation and Characterization of a Sulfate-Reducing Bacterium that Anaerobically Degrades Alkanes. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 65 (7), p. 2969-2976.

MING SO, C. & YOUNG, L.Y. (1999b). Initial Reactions in Anaerobic Alkane Degradation by a Sulfate Reducer, Strain AK-01. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 65 (12), p. 5332-5540.

MORAN, A.C.; ALEJANDRA MARTINEZ, M.; SENERIZ, F. (2002). Quantification of Surfactin in Culture supernatant by Hemolytic Activity. *Biotechnology Letters*. v. 24, p. 177-180.

MOREIRA, V. S. F. D. (1999). *Biodegradação de Naftaleno*. 163f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MORIKAWA, M.; ITO, M.; IMANAKA, T. (1992). Isolation of a New Surfactin Producer *Bacillus pumilus* A-1, and Cloning and Nucleotide Sequence of The Regulator gene, psf-1. *Journal of Bioengineering*. v. 74, p 255-261.

MÜLLER-HURTIG, R.; WAGNER, F.; ROMAN, B. KOSARIC, N. (1993). Biosurfactants for Environmental Control. *In: KOSARIC, N. Biosurfactants: Production – Properties – Applications*. New York: MARCEL DEKKER, INC. Cap.17, p. 447- 469.

MULLIGAN, C. N. (2005). Environmental Applications For Biosurfactants. *Environmental Pollution*. v. 133, p. 183-198.

NITSCHKE, M. & PASTORE, G. M. (2002). Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. *Química nova*. v. 25,n.5, p. 772-776.

NO, H.K.; PARK, N. Y.; LEE, S. H.; MEYERS, S. P. (2002). Antibacterial Activity of Chitosans and Chitosan Oligomers With Different Molecular Weights. *International Journal of Food Microbiology*. v. 74, p. 65-72.

NOORDMAN, W.H.; WACHTER, J. H. J.; BOER, G.J.; JANSSEN, D.B. (2002). The Enhancement by Surfactants of Hexadecane Degradation by *Pseudomonas aeruginosa* Varies With Substrate Availability. *Journal of Biotechnology*. v. 94, p. 195-212.

OH, Y.S.; MAENG, J.; KIM, S.J. (2000). Use of microorganism-immobilized polyurethane foams to absorb and degrade oil on water surface. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 54, p. 418-423.

OMUSABA, C. A.; YOSHIDA, N.; SEKIGUCHI, Y.; KARIYA, K.; OGAWA, K. (2000). Purification and Some Properties of a Novel Chitosanase From *Bacillus subtilis* KH1. *Journal General Applied Microbiology*. v. 46, p. 19-27.

PAJE, M. L.; MARKS, P.; COUPERWHITE, I. (1998). Degradation of Benzene by a *Rhodococcus* sp. Using immobilized cell systems. *World Journal Microbiology & Biotechnology*. v. 14, p. 675-680.

PIRES, F.R.; SOUZA, C.M.; SILVA, A.A.; PROCÓPIO, S.O.; FERREIRA, L.R. (2003). Fitorremediação de Solos Contaminados com Herbicidas. *Planta Daninha*. v. 21 (2). Viçosa May/Aug.

PIZA, F. A. T.; SILOTO, A. P.; CARVALHO, C. V.; FRANCO, T. T. (1999). Production, Characterization and Purification of Chitosanase From *Bacillus cereus*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.16, p. 185-192.

PUNTUS, I.F; SAKHAROSVKY, V.G.; FILONOV, A.E.; BORONIN, A. M. (2005). Surface Activity and Metabolism of Hydrocarbon-Degrading Microorganisms Growing on Hexadecane and Naphthalene. *Process Biochemistry*. v.40, p 2643-248.

QI, L.; XU, Z.; JIANG, X.; HU, C.; ZOU, X. (2004). Preparation and Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles. *Carbohydrates Research*. v. 339, p. 293-2700.

QUAN, X. SHI.; H.; ZHANG, Y.; WANG, J.; QIAN, Y. (2004). Biodegradation of 2,4-Diclorofenol and Phenol in Airlift Inner-Loop Bioreactor Immobilized With *Achromobacter* sp. *Separation and Purification Technology*. v.34, p. 97-103.

QUEK, E.; TING, Y-P; TAN, H. M.; (2005). *Rhodococcus* sp. F92 Immobilized on Polyurethane Foam Shows Ability to Degrade Various Petroleum Products. *Bioresource Technology*. p. 1-7.

RABEA, E.I.; BADAWY, M.E-T.; STEVENS, C. V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W.; (2003). Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules Reviews*. v. 4, n. 6, p.1457–1465.

RAHMAN, K. S. M.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; TAHIRA, R.J. BANAT, I. M. (2002). Towards Efficient Crude Oil Degradation by a Mixed Bacterial Consortium. *Bioresource Technology*. v. 85, p. 257-261.

RIBEIRO, M. C. & SOARES, M. M. S. R. (1998). *Microbiologia Prática: Roteiro e Manual – Bactérias e Fungos*. 1ª ed. Ed. ATHENEU – São Paulo – Rio de Janeiro – Belo Horizonte. p. 112.

RODRIGUEZ Jr., M.; KLASSON, T.; DAVISON, B. H. (2001). Enhancement of the Conversion of Toluene by *Pseudomonas putida* F-1 Using Organic Cosolvents. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 91-93, p 195-203.

RON, E. Z. & ROSENBERG, E. (2001). Minireview: Natural Roles of Biosurfactants. *Environmental Microbiology*. v. 3, n. 4, p. 229-236.

ROSATO, Y. B. (1998). Biodegradação do Petróleo. In: MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúma: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cap. 14, p. 307-334.

SCHALLMEY, M. SINGH, A. WARD, O. P. (2004). Developments in The Use of *Bacillus* Species for Industrial Production. *Canadian Journal Microbiology*. v. 50, p. 1-17.

SHIRAKAWA, M.A.; JOHN, V. M.; CINCOTTO, M. A.; GAMBALE, V. (2001). Contaminação da Água Subterrânea por Hidrocarbonetos de Petróleo e Conseqüente Biodeterioração de Concreto Projetado em Túnel. In: *BIODEGRADAÇÃO: Contribuição do II Workshop sobre Biodegradação*. Campinas,SP, Brasil 13-20 de junho, Embrapa Meio Ambiente.

SIEMANN, M. & WAGNER, F. (1993). Prospects and Limits for the Production of Biosurfactants Using Immobilized Biocatalysts. In: KOSARIC, N. *Biosurfactants: production – properties – applications*. New York: MARCEL DEKKER, INC. Cap. 3, p. 99- 446.

SOMASHEKAR, D. & JOSEPH, R. (1996). Chitosanases- Properties and Applications: a Review. *Bioresource Technology*. v. 55, p. 35-45.

SYNOWIECKI, J & ALI-KHATEEB, N.A. (2003). Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. v. 43, n. 2, p. 145-171.

THARANATHAN, R. N. & KITTUR, F. S. (2003). Chitin - The Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. v. 43, n. 1, p. 61-87.

THE PROKARYOTES – An Envolving Electronic Resource for The Microbiological Community (2006). Disponível em: <<http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>>. Acesso em: 22 de fevereiro 2006.

TSAI, G.J.; SU, W.H., CHEN, H.C.; PAN, C.L. (2002). Antimicrobial Activity of shrimp Chitin and Chitosan From Different Treatments and Applications of Fish Preservation. *Fisheries Science*.v.68, 170-177.

URURAHY, A. F. P. (1998). *Biorremediação de Resíduo Oleoso Proveniente de Refinaria*. 344f. Tese (Doutorado em Ciências Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

URURAHY, A.F.P.; MARINS, M.D.M.; VITAL, R. L.; GABARDO,I.T.; PEREIRA Jr., N. (1998a). Effect of Aeration Biodegradation of Petroleum Waste. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 29, n.4,p. 254-258.

URURAHY, A.F.P.; PEREIRA Jr, N.; MARINS, M.D.M. (1998b). Desempenho de um Biorreator do tipo CSTR no processo de degradação de Borra Oleosa. *Boletim Técnico. PETROBRAS*, Rio de Janeiro. v. 41 (3/4), p.125-132, jul/dez.

VALENTINI, A.; LARANJEIRA, M.C.M.; FIORI, S.; FÁVERE, V.T. (2000). Processo Alternativo para a Remoção de Cobre (II) e Níquel (II) de Soluções Aquosas Utilizando Cápsulas de Quitosana – Álcool Polivinílico. *Química Nova*. v. 23, n. 1, p. 12-15.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. (2003). Recentes Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 67, n.4, p. 503-549.

VASILEVA-TONKOVA, E. & GESHEVA, V. (2005). Gcolipids Produced by *Antarctic Nocardioides sp.* During growth on n-paraffin. *Process Biocheemistry*. v. 40, p. 2387-2391.

VITAL, N. (1992). *Formação de emulsificantes por Candida guilliermondi T9 a partir de querosene*. Dissertação (Mestrado em Química) – Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

VORLOP, K.D. & KLEIN, J. (1980). Entrapment of Microbial Cells in Chitosan. In: *Methods in Enzymology*. v. 135, p. 259-268.

ZENGH, L. Y.; ZHU, J.F. (2003). Study on Antimicrobial Activity of Chitosan With Different Molecular Weights. *Carbohydrate Polymers*. v. 54, p. 527-530.

WANG, X.; DU, Y.; FAN, L.; LIU, H.; HU, YING. (2005). Chitosan-Metal Complexes as Antimicrobial Agente: Synthesis, Characterization and Structure-Activity Study. *Polymer Bulletin*. v. 55, p. 105-113.

WASKO, M. P. & BRATT, R. P. (1990). Properties of a Biosurfactant Produced by The Fuel Contaminant *Ochrobactrum anthropi*. *International Biodeterioretion*. v. 27 p. 265-273.

WEN-TAO, Q.; WEI-TING, Y.; YU-BING, X.; XIAOJUN, M. (2005). Optimization of *Saccharomyces cerevisiae* Culture in Alginate-Chitosan-Alginate Microcapsule. *Biochemical Engineering Journal*. v. 25, p. 151-157.

WHITE, L.G.; HAWARI, J.; ZHOU, E.; BOURBONNIÉRE, L.; INNIS, W.E.; GREER, C.W. (1998). Biodegradation of Variable-Chain-Length Alkanes at Low Temperatures by a Psychrotrophic *Rhodococcus sp.* *Applied and Environmental*. v.64 (7), p. 2578-2584.

WOODWARD, J. (1988). Methods of Immobilization of Microbial Cells. *Journal of Microbiological Methods*. v. 8. p. 91-102.

WU, F.; TSENG, R.; JUANG, R. (2001). Enhanced Abilities of Highly Swollen Chitosan Beads For Color Removal and Tyrosinase Immobilization. *Journal of Hazardous Materials*. p.167-177.

YANG, L.; LAI, C.T.; SHEIH. (1999). Biodegradation of Dispersed Diesel Fuel under High Salinity Conditions. *Water Research*. v. 34, n13, p. 3303-3314.

YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E., NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; KNAPP, R. M.; MCLNERNEY, M. J. (2004). Comparison of Methods to Detect Biosurfactants Production by Diverse Microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. v. 56, p. 339-347.

7. ANEXO (Cromatogramas)

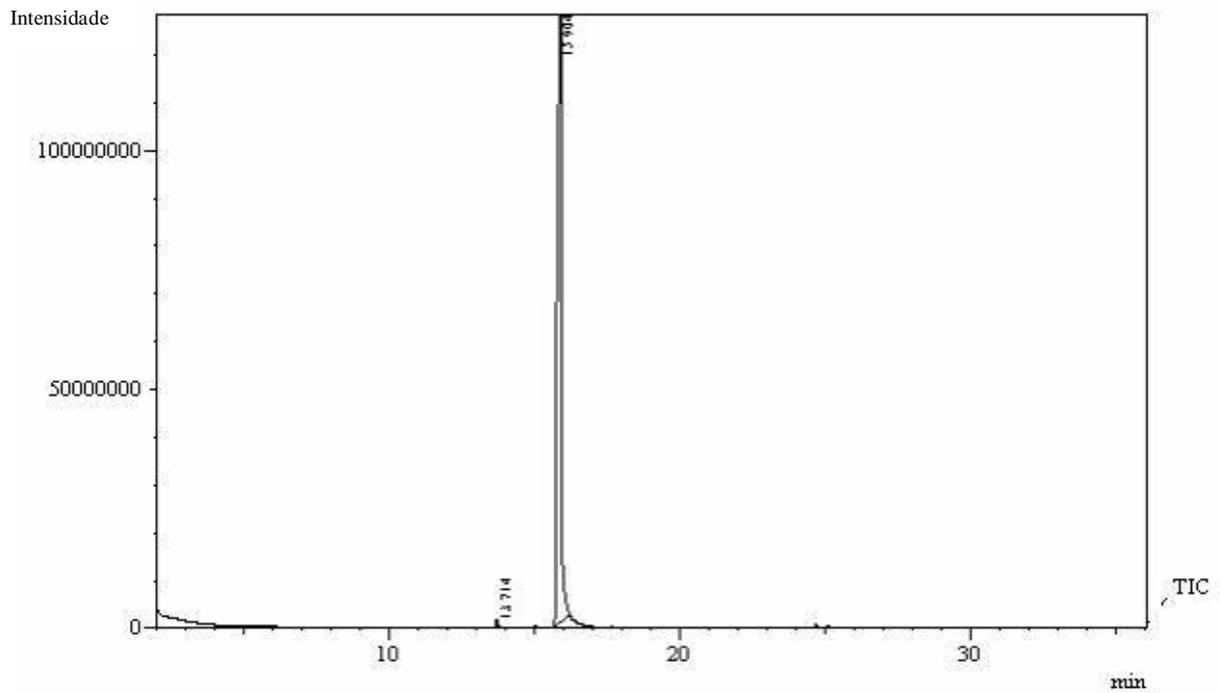


Figura 7.1: Perfil Cromatográfico do n-Hexadecano: Amostra Controle no Tempo Zero.

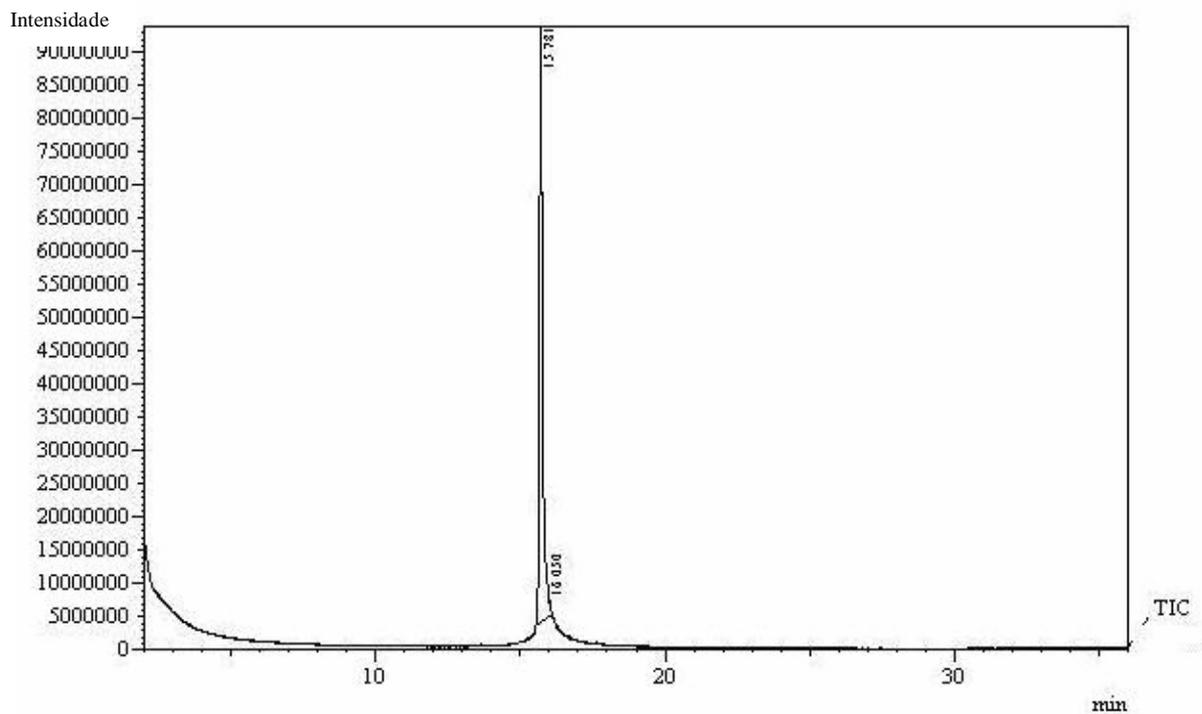


Figura 7.2: Perfil Cromatográfico do n-Hexadecano: Amostra Teste Após 48 Horas de Experimento com Células Livres.

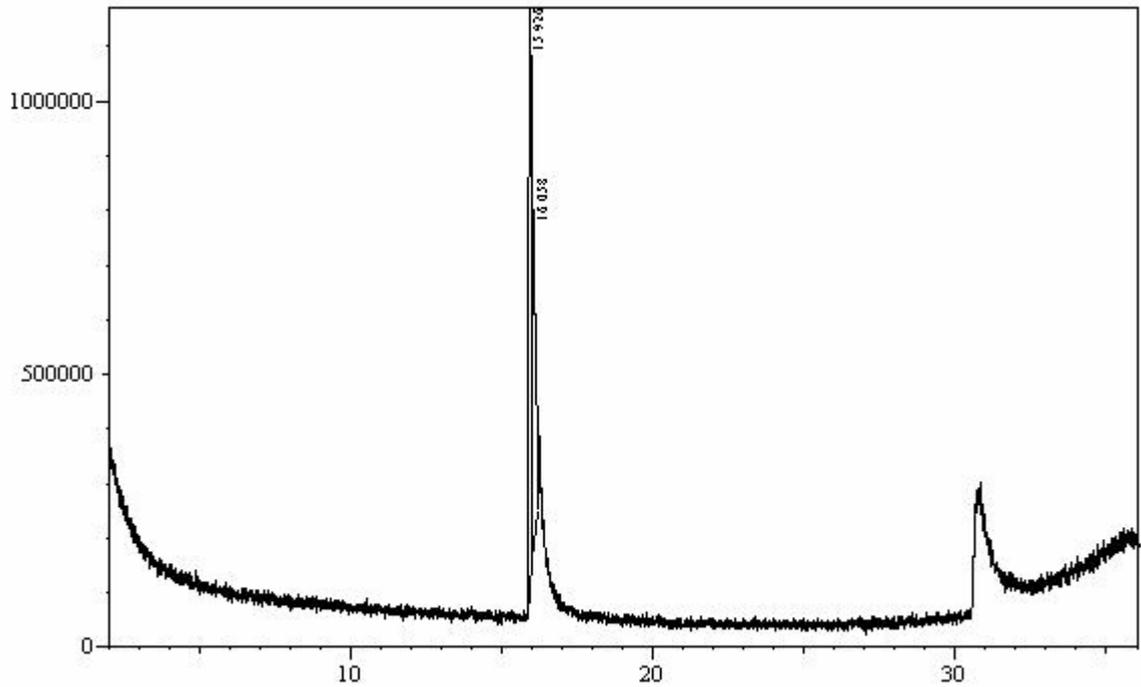


Figura 7.3: Perfil Cromatográfico do n-Hexadecano: Amostra Teste Após 96 Horas de Experimento com Células Livres.

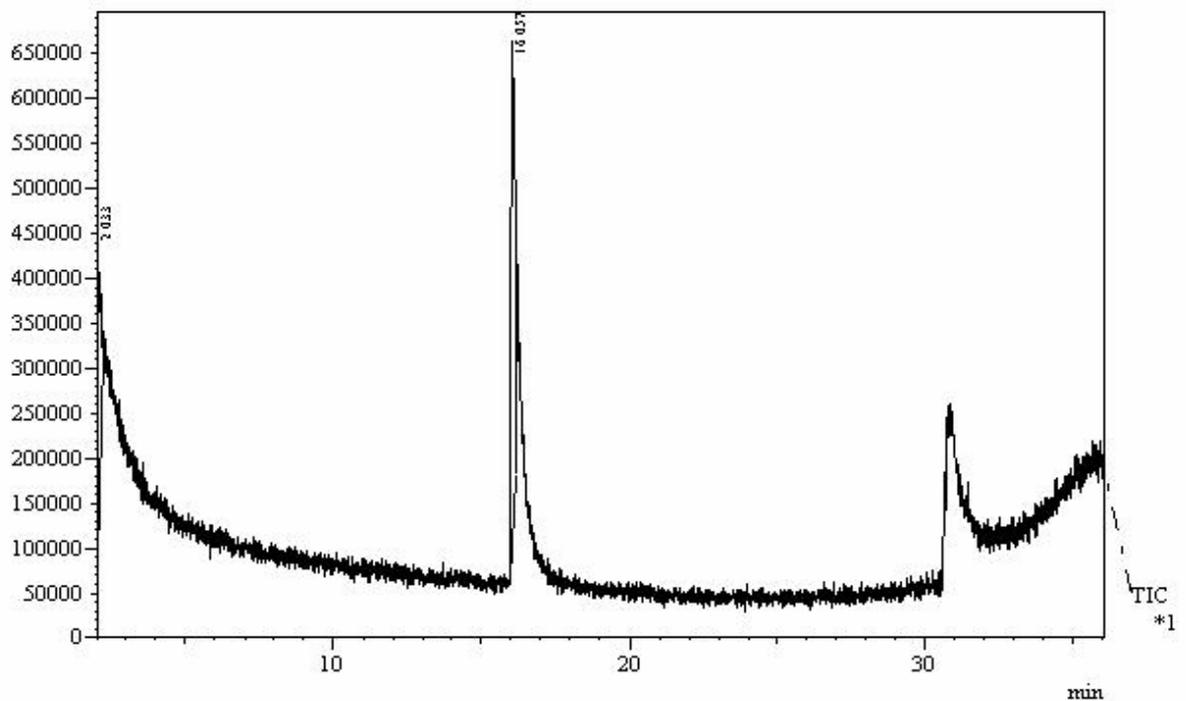


Figura 7.4: Perfil Cromatográfico do n-Hexadecano: Amostra Teste Após 144 Horas de Experimento com Células Livres.

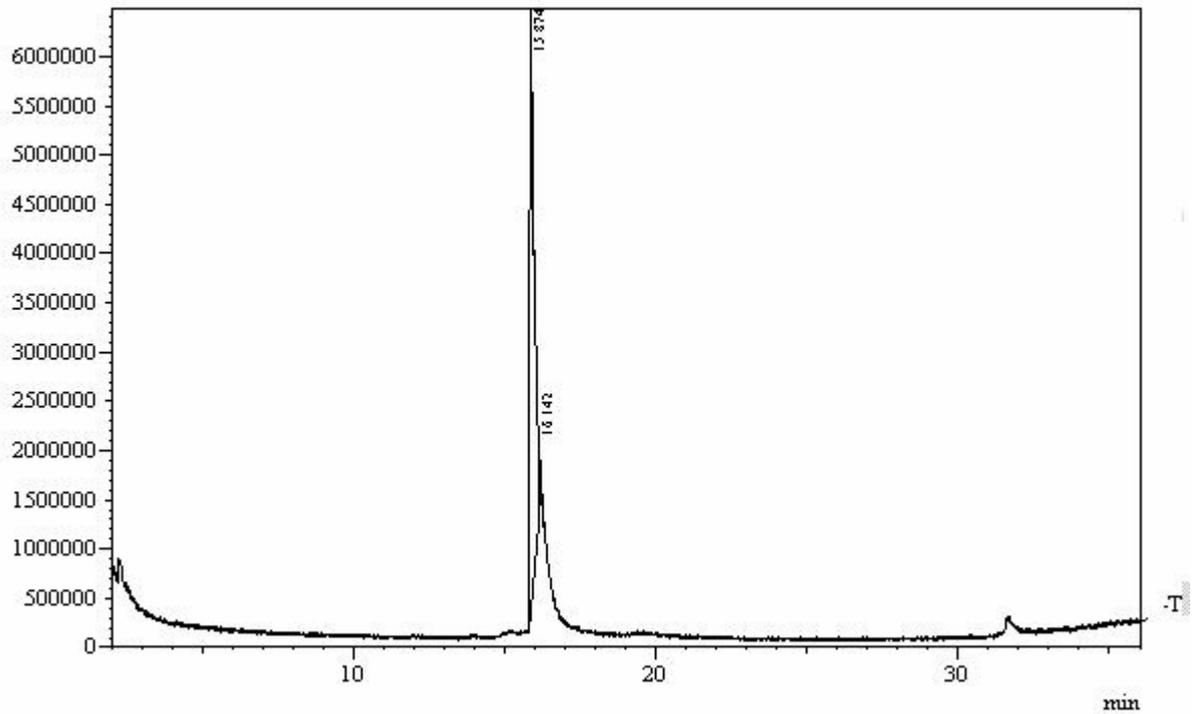


Figura 7.5: Perfil Cromatográfico do n-Hexadecano: Amostra Teste Após 48 Horas de Experimento com Bactérias Imobilizadas (*Beads*).

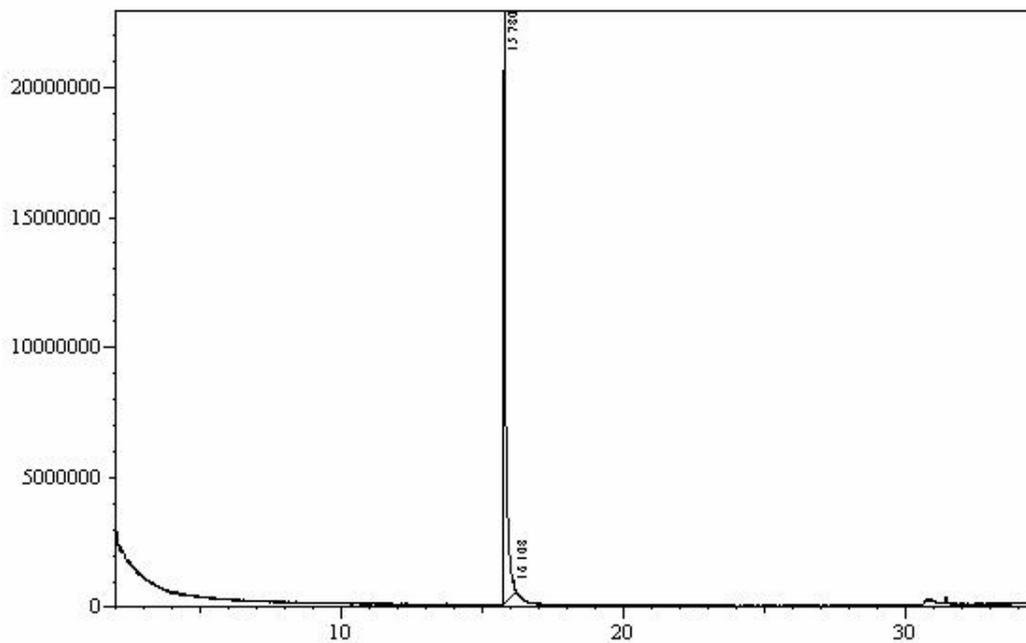


Figura 7.6: Perfil Cromatográfico do n-Hexadecano: Amostra Teste Após 96 Horas de Experimento com Bactérias Imobilizadas (*Beads*).

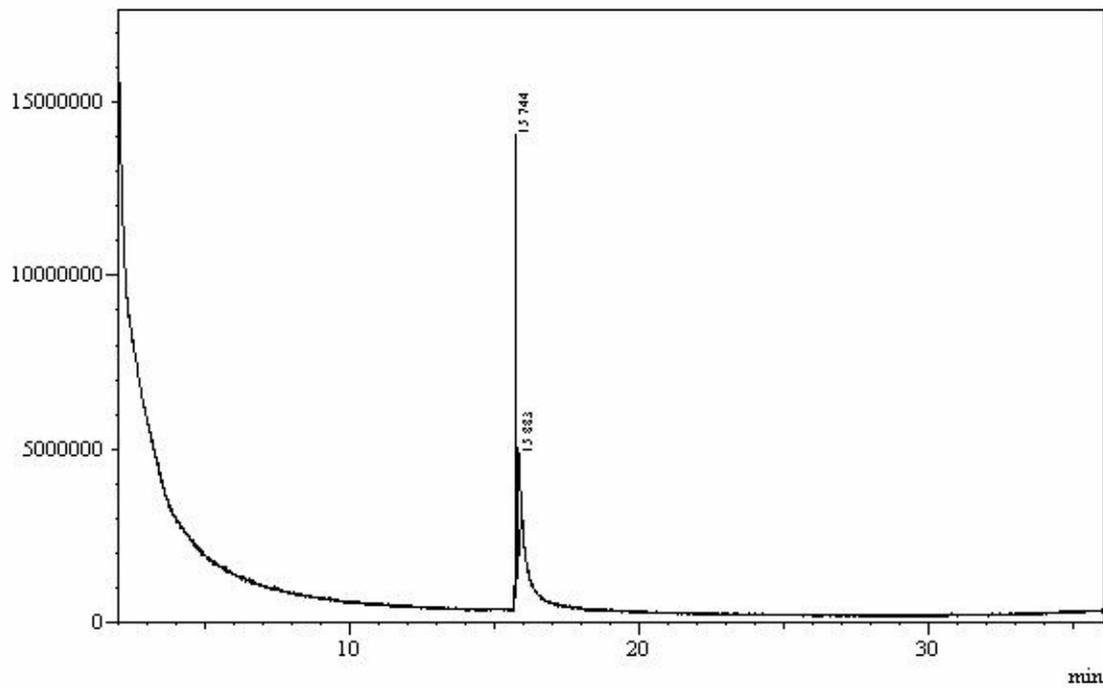


Figura 7.7: Perfil Cromatográfico do n-Hexadecano: Amostra Teste Após 144 Horas de Experimento com Bactérias Imobilizadas (*Beads*).