



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Tecnologia e Geociências
Departamento de Engenharia Civil
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil
Área de Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS TOLERANTES AO
NAFTALENO DAS AREIAS DA PRAIA DE SUAPE-PE E
PRODUÇÃO SIMULTÂNEA, POR *Pseudomonas aeruginosa*,
DE RAMNOLIPÍDEO E POLIHIDROXIALCANOATO**

Danilo Mamede da Silva Santos

Recife

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Tecnologia e Geociências
Departamento de Engenharia Civil
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil
Área de Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS TOLERANTES AO
NAFTALENO DAS AREIAS DA PRAIA DE SUAPE-PE E
PRODUÇÃO SIMULTÂNEA, POR *Pseudomonas aeruginosa*,
DE RAMNOLIPÍDEO E POLIHIDROXIALCANOATO**

Danilo Mamede da Silva Santos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Engenharia Civil, na área de Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

Orientador: Prof. Dr. Mario Takayuki Kato

Recife

2013

Catálogo na fonte
Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

- S237d Santos, Danilo Mamede da Silva.
Diversidade de bactérias tolerantes ao naftaleno das areias da Praia de Suape-PE e produção simultânea, por *Pseudomonas aeruginosa*, de ramnolipídeo e polihidroxialcanoato / Danilo Mamede da Silva Santos. - Recife: O Autor, 2013.
xiii, 87 folhas, il., gráfs., tabs.
- Orientador: Prof. Dr. Mario Takayuki Kato.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2013.
Inclui Referências.
1. Engenharia civil. 2. Ambiente salino. 3. Biorremediação. 4. Hidrocarbonetos. 5. Catecol. 6. Biossurfactante. I. Kato, Mario Takayuki. II. Título.

UFPE

624 CDD (22. ed.)

BCTG/2014-014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

A comissão examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS TOLERANTES AO NAFTALENO DAS
AREIAS DA PRAIA DE SUAPE-PE E PRODUÇÃO SIMULTÂNEA, POR**

***Pseudomonas aeruginosa*, DE RAMNOLIPÍDEO E**

POLIHIDROXIALCANOATO

defendida por

Danilo Mamede da Silva Santos

Considera o candidato APROVADO

Recife, 09 de agosto de 2013

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Mario Takayuki Kato – UFPE
(orientador)

Prof. Dr. Antonio Fernando de Souza Queiroz – UFBA
(examinador externo)

Prof.^a Dr.^a Alessandra Carla Oliveira Chagas Spinelli – UFERSA
(examinadora externa)

Prof.^a Dr.^a Gláucia Manoella de Souza Lima – UFPE
(examinadora externa)

Prof.^a Dr.^a Elizabeth Amaral Pastich Gonçalves – UFPE
(examinadora externa)

Prof.^a Dr.^a Sávia Gavazza dos Santos Pessôa – UFPE
(examinadora interna)

Se diante de mim não se abrir o mar,
Deus vai me fazer andar por sobre as águas.

Amo a vida a cada segundo, pois, para viver eu transformei
meu mundo. Abro feliz o peito, é meu direito!

Ricardo MacCord/ Ângela Rô Rô

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me fazer andar por sobre as águas em todos os momentos em que o mar não se abriu... Pelas grandes obras que fez e continua a fazer em minha vida, a ti Senhor que és fiel, muito obrigado!

Ao meu orientador, Prof. Mario Takayuki Kato, pela orientação, amizade, presteza, disponibilidade de ajuda, conselhos valiosos e confiança.

À professora Lourdinha Florêncio, pelos conselhos valiosos e disponibilidade de ajuda.

Ao meu orientador (Tutor) no exterior, o prof. Jean Martins, pelo acolhimento, orientação e disponibilidade de ajuda.

Aos meus pais, Edilemos Mamede e Rita de Cássia, pelo amor, carinho, compreensão, amizade, apoio, dedicação e exemplo de vida.

Ao meu irmão e cunhada, Saulo Mamede e Pollyana Melo, pelo apoio, amor, respeito e compreensão.

À minha avó Maria Zélia, pelo amor, oração e exemplo de vida.

Aos meus familiares: Wilson Silva, José Wilson, Marcelo Fragoso, Filipe Wilson, Jurandi Mamede, Fátima Fragoso, Solange Fragoso e Sandra Fragoso pelo apoio, carinho, amor, respeito e incentivo.

Ao amigo João de Paula por estar sempre ao meu lado me apoiando.

Aos amigos: Beth Pastich, Clara Mendonça, Dani Patrice, Juliana Moraes, Luiza Feitosa, Gláucia Lima e Djama Ferraz, pela amizade, apoio, incentivo, amabilidade, disponibilidade de ajuda, compreensão, desabafo, respeito, abraços e sorrisos que tornavam meus dias mais felizes.

Aos amigos da Université Jouseph Fourier: Aline Navel, Aurélien Desaunay e Erwann Vince, pelos momentos juntos na França, dos quais jamais esquecerei. Muito obrigado pelo apoio, incentivo, presteza e sorriso que ilusionavam a saudade de casa.

Aos colegas da Universidade Estadual da Bahia, UNEB, em especial aos membros do Colegiado de Engenharia de Pesca, pelo incentivo, apoio e amizade.

Aos amigos: Fabiana Lima, Renê Marcelino, Hélio Inácio, Cristiana Marinho, Juliana Ribeiro, Kátia Brilhante pelas “fechações”, amabilidade, apoio, incentivo e afeto.

A todos que fazem parte do Laboratório de Saneamento Ambiental da UFPE, em especial ao técnico Ronaldo Fonseca, pela amizade e disponibilidade de ajuda.

Ao ex-estagiário do LSA, graduando em química industrial, César Augusto, pela ajuda nos experimentos, apoio e amizade.

Ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da UFPE, pela oportunidade em realizar meu Curso de Doutorado, em especial a secretária Andrea Negromonte pela atenção especial sempre que solicitado.

A todos os professores do Doutorado em Engenharia Civil, área de Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos da UFPE, por terem contribuído para a minha formação acadêmica.

À prof^a. Janete Magali, do Departamento de Antibióticos da UFPE, por ter cedido, gentilmente, as culturas de *Pseudomonas aeruginosa* para a elaboração desse trabalho.

Ao Laboratório da Central Analítica da UFPE, em especial a técnica Abene Ribeiro e ao prof. Ricardo Oliveira pela ajuda nas análises de LCMS-IT-TOF.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), em especial a prof^a. Christina Peixoto e as técnicas: Gabriela (Gabi), Maria da Conceição (Ceça) e Joseane (Jô), pela ajuda nas análises de microscopia eletrônica.

Ao CPRH (Agência Estadual de Meio Ambiente da Companhia Pernambucana de Recursos Hídricos), em especial a técnica Maria do Carmo (Carminha), pela ajuda nos ensaios de ecotoxicidade.

A todos que fazem parte do Laboratoire des Transferts en Hydrologie et Environnement da Université Jouseph Fourier pela execução de uma parte do trabalho e pelo acolhimento que os integrantes do laboratório tiveram por mim.

À FACEPE pelo apoio financeiro da bolsa de pesquisa no Brasil.

À CAPES pelo apoio financeiro da bolsa de pesquisa no exterior.

Ao CNPq pelo apoio financeiro do projeto de pesquisa.

A todos os professores e amigos que juntos contribuíram para minha formação profissional, em especial a prof^a Fátima Queiroz pelos ensinamentos, amizade e estímulo.

A todos que não foram citados, mas que de alguma forma colaboraram com a execução dessa vitória, meu MUITO OBRIGADO!

Lista de Tabelas

	Pág.
Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes por PCR.	46
Tabela 2: Valores dos índices de emulsificação (%).	73
Tabela 3: Caracterização dos análogos de ramnolipídeos nas amostras analisadas.	74

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1: Mapa do litoral de Pernambuco, com as subdivisões. Setores: norte, metropolitano e sul.	17
Figura 2: Praia de Suape durante maré de sizígia.	18
Figura 3: Estrutura dos ramnolipídeos. Ramnolipídeo 1: mono-ramno-di-lipídeo; Ramnolipídeo 2: mono-ramno-mono-lipídeo; Ramnolipídeo 3: di-ramno-di-lipídeo; Ramnolipídeo 4: di-ramno-mono-lipídeo.	25
Figura 4: Estrutura linear de PHAs.	27
Figura 5: Biossíntese de PHAs por <i>Pseudomonas</i> .	29
Figura 6: Localização da área de estudo na região litorânea do estado de Pernambuco, município do Cabo de Santo Agostinho, enfocando o local de coleta (maracado por uma seta)	43
Figura 7: Dendograma com a análise do perfil da diversidade das bactérias isoladas da praia de Suape.	51
Figura 8: Produção de ramnolipídeo expresso em raminose ao longo do tempo. (a) UFPEDA-563; (b) UFPEDA-564; (c) UFPEDA-571; (d) UFPEDA-559; (e) UFPEDA-572; (f) UFPEDA-614.	69
Figura 9: Biomassa expressa em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/ mL) ao longo do tempo. (a) UFPEDA-563; (b) UFPEDA-564; (c) UFPEDA-571; (d) UFPEDA-559; (e) UFPEDA-572; (f) UFPEDA-614.	71
Figura 10: Variação dos valores de pH ao longo do tempo. (a) UFPEDA-563; (b) UFPEDA-564; (c) UFPEDA-571; (d) UFPEDA-559; (e) UFPEDA-572; (f) UFPEDA-614.	72
Figura 11: Espectro de massa dos ramnolipídeos produzidos por estirpes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA-563; UFPEDA-571e UFPEDA-572, isoladas de poços de petróleo.	75
Figura 12: Inclusões de PHA no interior das células (setas) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vistas no aumento de 0,5µm em microscópio eletrônico de transmissão. (A): <i>P. aeruginosa</i> UFPEDA-559; B): <i>P. aeruginosa</i> UFPEDA-563; (C): <i>P. aeruginosa</i> UFPEDA-564; (D): <i>P. aeruginosa</i> UFPE-DA-571; (E): <i>P. aeruginosa</i> UFPEDA-572; (F): <i>P. aeruginosa</i> UFPEDA-614.	77

Sumário

	Pág.
Lista de Tabelas	vii
Lista de Figuras	viii
Resumo	xii
Abstract	xiii

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E ESBOÇO DA TESE

1. Introdução	15
1.1. Objetivos	19
1.2. Esboço da Tese	19
1.3. Referências	20

CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. Revisão Bibliográfica	23
2.1. Biorremediação	23
2.2. Surfactantes	24
2.3. Biossurfactantes	24
2.4. Ramnolipídeos	25
2.4.1. Aplicação dos ramnolipídeos no tratamento de petroderivados	26
2.5. Polihidroxialcanoatos	27
2.6. Biossíntese de PHAs por <i>Pseudomonas</i>	28
2.7. Produção simultânea de ramnolipídeos e polihidroxialcanoatos	29
2.8. Referências	31

CAPÍTULO 3. DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DE AMBIENTE COSTEIRO TROPICAL E SUAS POTENCIALIDADES EM BIODEGRADAR O NAFTALENO

Manuscrito 1	38
Resumo	39
Abstract	40
3.1. Introdução	41

3.2. Material e métodos	42
3.2.1. Sítios de coleta	42
3.2.2. Análise do solo	42
3.2.3. Reagente e solução	43
3.2.4. Enriquecimento das culturas para o isolamento e condições de crescimento	44
3.2.5. Quantificação de bactérias biodegradadoras de naftaleno	44
3.2.6. Identificação da diversidade bacteriana utilizando 16S rDNA como biomarcador	45
3.2.7. Identificação de bactérias degradadoras de naftaleno utilizando a região naftaleno dioxigenase (nahAc) como biomarcador	46
3.2.8. Análise das vias de degradação de bactérias através dos genes catecol dioxigenase	47
3.2.9. Análise filogenética	47
3.3. Resultados e discussão	48
3.3.1. Caracterização do solo	48
3.3.2. Enriquecimento das culturas para o isolamento e condições de crescimento	49
3.3.3. Quantificação de bactérias biodegradadoras de naftaleno	50
3.3.4. Identificação da diversidade bacteriana utilizando 16S rDNA, naftaleno dioxigenase (nahAc), catecol 1,2-dioxigenase e catecol 2,3-dioxigenase como biomarcadores	51
3.4. Conclusões	53
3.5. Referências	53

CAPÍTULO 4. PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE RAMNOLIPÍDEO E POLIHIDROXIALCANOATOS POR ESTIRPES DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE POÇOS DE PETRÓLEO

Manuscrito 2	60
Resumo	61
Abstract	62
4.1. Introdução	63
4.2. Material e métodos	64
4.2.1. Micro-organismos	64
4.2.2. Produção do biossurfactante ramnolipídeo	65

4.2.3. Determinação da concentração do biossurfactante	65
4.2.4. Extração e purificação do biossurfactante	65
4.2.5. Caracterização do biossurfactante por LCMS-IT-TOF	66
4.2.6. Índice de emulsificação	66
4.2.7. Caracterização de polihidroxialcanoatos em microscopia eletrônica de transmissão	67
4.2.8. Ensaio de ecotoxicidade utilizando o micro crustáceo <i>Daphnia magna</i> como bioindicador ambiental	67
4.3. Resultados e discussão	68
4.3.1. Determinação da produção e concentração do biossurfactante ramnolipídeo	68
4.3.2. Índice de emulsificação	72
4.3.3. Caracterização do biossurfactante por LCMS-IT-TOF	74
4.3.4. Caracterização do polihidroxialcanoato em microscopia eletrônica de transmissão	77
4.3.5. Ensaio de ecotoxicidade aguda	78
4.4. Conclusões	79
4.5. Referências	80

CAPÍTULO 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. Considerações Finais	86
-------------------------	----

RESUMO

Acidentes causados por petróleo e derivados representam um problema devido a sua persistência e difícil assimilação no meio ambiente. Para que ocorra a biodegradação do produto oleoso, é necessário que haja a interação das gotas de óleo com os microrganismos, podendo ser mediada por biossurfactantes. Os biossurfactantes do tipo ramnolipídeo são constituídos por uma ou duas moléculas de raminose ligada a uma ou duas moléculas de β -hidrozidecanóico sendo produzidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar o potencial de biodegradação do naftaleno e do catecol, por bactérias isoladas da areia da praia de Suape, e avaliar a produção simultânea do biossurfactante ramnolipídeo e o polímero polihidroxicanoato, utilizando estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*, isoladas de poços de petróleo do Canto do Amaro-RN. Foram realizados o isolamento, seleção e identificação de microrganismos endógenos da areia da praia de Suape; posteriormente foram realizados ensaios de produção e identificação do biossurfactante ramnolipídeo com substrato hidrofílico (glicerol); e ensaios de microscopia eletrônica de varredura transmissão para detecção de polihidroxicanoatos (PHA) e ensaios de ecotoxicidade. Durante todos os ensaios foram realizadas medições de: pH, crescimento microbiano, produção de ramnolipídeo através da determinação da concentração de raminose e análise cromatográfica por LCMS-IT-TOF. A análise dos resultados evidencia que a produção do biossurfactante ramnolipídico, para as linhagens bacterianas estudadas, nem sempre está associada ao crescimento celular. O glicerol proveniente da refinaria do biodiesel se mostrou promissor para a produção de metabólitos tensoativos como os ramnolipídeos, sendo a linhagem DAUFPE-563 a que melhor que produziu, 3,27 g/L de raminose com 120 horas de fermentação. As bactérias isoladas da praia de Suape não apresentam potencial genético para a degradação de hidrocarbonetos poliaromáticos. Este trabalho permitiu fortalecer os conhecimentos em relação à petroderivados, quanto aos principais constituintes que conferem toxicidade e persistência no ambiente, e destacar os biossurfactantes produzidos através de um resíduo, como um recurso para minimizar danos ao meio ambiente.

Palavras-chave: ambiente salino; biorremediação; hidrocarbonetos; catecol; biossurfactante.

ABSTRACT

Accidents caused by oil and oil products represent a problem due to their persistence and difficult to assimilate into the environment. For the biodegradation of ~~to occur~~ oily product, it is necessary that the interaction between oil droplets and the microorganisms, which can be mediated by biosurfactants. The rhamnolipid biosurfactant type consists of one or two molecules of rhamnose attached to one or two molecules of β -hidrosidecanoic being produced mainly by *Pseudomonas aeruginosa*. The objective of this study was to analyze the potential for biodegradation of naphthalene and catechol by bacteria isolated from the sandy beach of Suape, and the simultaneous production of the biosurfactant rhamnolipid and polyhydroxyalkanoate polymer, using strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wells oil Canto do Amaro-RN. Thus, we performed the isolation, selection and identification of endogenous microorganisms from the sand beach of Suape; the production tests and identification of biosurfactant rhamnolipid with hydrophilic substrate (glycerol); tests with scanning transmission electron microscopy for detection of polyhydroxyalkanoates (PHA); and ecotoxicity tests. Throughout all the assays, several measurements were made: pH, microbial growth, rhamnolipid production by determining the concentration of rhamnose, and chromatographic analysis by LCMS-IT-TOF. The results show that the production of the biosurfactant ramnolipídico for bacterial strains studied is not always associated with cell growth. The glycerol derived from biodiesel refinery showed to be promise for the production of metabolites, such as surfactants ramnolipídeos. The DAUFPE-563 strain was the best and produced 3.27 g/ L rhamnose during 120-h fermentation. Bacteria isolated from the beach Suape do not have the genetic potential to degrade polyaromatic hydrocarbons. This work allowed to strength knowledge regarding petroderivative main constituents that confer toxicity and persistence in the environment; and to highlight a biosurfactant produced from a residue, as a potential resource to minimize environment damage.

Keywords: saline environment, bioremediation, hydrocarbons; catechol; biosurfactant.

01 Introdução, objetivo e esboço da tese.

02 Revisão Bibliográfica

03 Diversidade de bactérias de ambiente costeiro tropical e suas potencialidades em biodegradar o naftaleno

04 Produção simultânea de ramnolipídeo e polihidroxialcanoatos por estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de poços de petróleo

05 Considerações Finais

1. INTRODUÇÃO

Acidentes ocasionados por derramamento de petróleo e derivados representam um problema de escala mundial por causarem um grande impacto ao meio ambiente, gerando ou aumentando a poluição. A contaminação de solos e do ambiente hídrico por hidrocarbonetos, geralmente por perdas ou rompimentos de dutos, ou por acidentes ocorridos no seu transporte, tem um impacto pronunciado sobre as propriedades do ambiente, provoca toxicidade sobre os micro-organismos e mortandade dos organismos. Devido a esses fatos, vem se buscando tecnologias capazes de reduzir o volume e a toxicidade dos rejeitos gerados por derrames de petróleo e derivados.

Dentre os acidentes ecológicos provocados por derramamento de produtos oleosos, pode-se destacar o ocorrido em janeiro de 2000, no Brasil, onde houve o derramamento de cerca de 1,3 milhões de litros de petróleo na Baía de Guanabara (RJ). O desastre ecológico atingiu regiões de manguezal, afetando bruscamente o ecossistema.

Dentre as estratégias utilizadas para recuperação de ambientes poluídos por compostos oleosos, a biorremediação se apresenta como a menos agressiva ao meio ambiente e a mais adequada para a manutenção do equilíbrio ecológico (Semple et al., 2001). A estrutura dos compostos de hidrocarbonetos pode influenciar a velocidade de biodegradação, pois está relacionada com a biodisponibilidade do composto à ação microbiana. Um bom resultado na biorremediação vai depender da genética, do metabolismo e da fisiologia dos microrganismos empregados no processo (Eckenfelder, 1989; Ururahy, 1998).

Assim, para que ocorra a biodegradação do produto oleoso, é necessário que haja a interação das gotas de óleo com os micro-organismos. Esta interação pode ser mediada por biossurfactantes, os quais apresentam propriedades tensoativas, formando micelas que solubilizam parcialmente as gotas de óleo, favorecendo a ação microbiana (Fleck et al., 2000; Schipper *et al.*, 2000).

Entre os biossurfactantes, a classe dos glicolipídeos compreende um grupo dos mais conhecidos e estudados. Nesta classe, destacam-se os ramnolipídeos, trealolipídeos e soforolipídeos. Os ramnolipídeos são constituídos por uma ou duas moléculas de raminose ligada a uma ou duas moléculas de β -hidroxidecanoico. Os principais ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* são constituídos por L-ramnosil-L- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (RL1) (Desai e Banat, 1997). A

aplicação dos ramnolipídeos está relacionada com a despoluição de oceanos e praias em virtude do derramamento de óleo e remediação do solo.

Alguns micro-organismos, como os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, podem produzir biossurfactantes quando crescem na presença de diferentes substratos, variando desde carboidratos simples a hidrocarbonetos complexos. O uso de diferentes fontes de carbono altera a estrutura dos biossurfactantes produzidos e, conseqüentemente, suas propriedades emulsificantes. Essas mudanças podem ser benéficas quando se desejam propriedades específicas para uma aplicação direcionada.

Alguns gêneros de bactérias, dentre elas as do gênero *Pseudomonas*, acumulam polihidroxialcanoatos na forma de grânulos intracelulares. Estes polímeros contêm, em geral, 3-hidroxidecanoato (3HD) e 3-hidroxi octanoato (3HO), entre outros constituintes. Polihidroxialcanoatos (PHA) são polímeros que podem ser acumulados por algumas bactérias em grande quantidade sem afetar a pressão osmótica das células; chegam a representar até 80% da massa celular seca (Anderson e Dawes, 1990). A função mais frequentemente atribuída a estes grânulos é a de reserva de carbono, energia e equivalentes redutores.

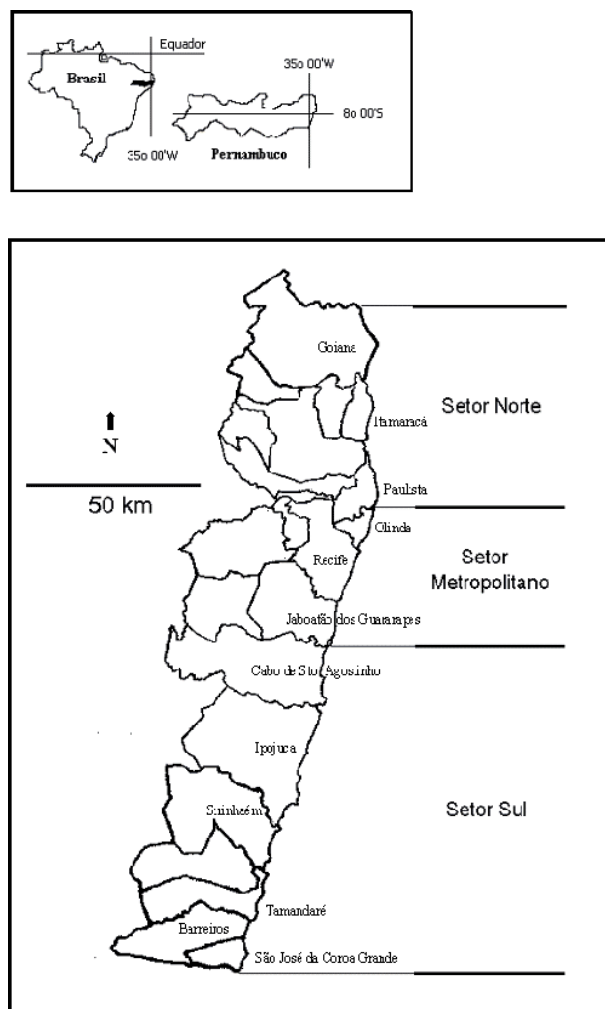
Existem vários trabalhos de biorremediação de derivados de petróleo envolvendo o isolamento e a seleção de micro-organismos biodegradadores de derivados de petróleo em regiões de clima temperado, porém são escassos os trabalhos desenvolvidos em regiões tropicais como no litoral do Nordeste do Brasil, o que torna este estudo importante sob o ponto de vista científico.

A posição geográfica do Estado de Pernambuco faz do Terminal Portuário de Suape um dos mais importantes do continente sul-americano, tornando-o um centro concentrador de cargas do Atlântico Sul, juntamente com o Porto de Santos. Este terminal movimenta os seguintes derivados de petróleo: óleo Diesel, gasolina, querosene e *bunker*, o que cria uma situação de risco potencial, com a possibilidade de contaminação de áreas com elevada importância ecológica, histórica e turística. Esse fato impulsiona o estudo de medidas de mitigação de impactos ambientais, como a biorremediação.

De acordo com o Programa de Gerenciamento Costeiro de Pernambuco - GERCO-PE, os municípios da Zona Costeira Pernambucana encontram-se agrupados em três setores (Figura 1): Norte (Goiana, Itamaracá, Igarassu, Abreu e Lima, Paulista, Itapissuma e Itaquitinga); Metropolitano (Olinda, Recife, Jaboatão dos Guararapes, São

Lourenço da Mata, Camaragibe e Moreno) e Sul (Cabo de Santo Agostinho, Ipojuca, Sirinhaém, Rio Formoso, Tamandaré, Barreiros e São José da Coroa Grande).

Figura 1: Mapa do litoral de Pernambuco, com as subdivisões. Setores: norte, metropolitano e sul (Fonte: Araújo et al., 2007).



O tráfego de derivados de petróleo, a instalação da refinaria de petróleo Abreu e Lima e o armazenamento de produtos potencialmente poluentes, inspiram cuidados quanto aos danos que estas atividades podem causar ao meio ambiente. A implantação do Complexo Industrial Portuário de Suape (CIPS), juntamente com a refinaria de petróleo Abreu e Lima, pode vir a provocar alterações permanentes ao meio ambiente local, em caso de acidentes, podendo comprometer a qualidade e sustentabilidade dos ecossistemas aquático e terrestre em função do potencial de emissão de poluentes tóxicos e acumulativos.

O CIPS opera navios durante todo ano, sem restrições de horário de maré, movimentando mais de cinco milhões de toneladas de carga por ano, destacando-se os derivados de petróleo, e pode atender a navios de até 170.000 toneladas.

A baía de Suape (Figura 2) está localizada no município do Cabo de Santo Agostinho, na costa Sul do estado de Pernambuco, Brasil, entre 8°15' – 8°30'S e 34°55' – 35°05'W. Situada na faixa intertropical de clima quente e úmido do tipo Aw', segundo a classificação de Köppen, com massas de ar equatoriais e tropicais. A temperatura média anual é de 24°C, a umidade relativa média anual é superior a 80% e o regime pluviométrico varia entre 1.850 mm e 2.364 mm concentrado nos meses de março a agosto (Koenig et al., 2002; Teódulo et al., 2003; Silva et al., 2004; Peel et al., 2007).

Figura 2: Praia de Suape durante maré de sizígia.



Esta tese de doutorado descreve as atividades desenvolvidas na pesquisa de processos de biorremediação nas areias da praia de Suape - PE; no intuito de fortalecer os conhecimentos em relação ao hidrocarboneto poliaromático naftaleno, surgindo como um recurso para minimizar danos ao meio ambiente, fornecendo uma melhor compreensão da biodiversidade das bactérias do sedimento da praia, com potencial biodegradante para hidrocarbonetos poliaromáticos e produção do biossurfactante ramnolípídeo; valendo-se de estratégias para possíveis medidas de remediação em caso de acidentes por derivados de petróleo.

1.1. OBJETIVOS

Os objetivos da pesquisa apresentadas nesta tese foram: analisar o potencial de biodegradação do naftaleno e do catecol, por bactérias isoladas da areia da praia de Suape, e avaliar a produção simultânea do biossurfactante ramnolipídeo e o polímero polihidroxialcanoato, utilizando estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*, isoladas de poços de petróleo.

1.2. ESBOÇO DA TESE

O capítulo 1 aborda o tema desta tese, objetivos e sua relevância, no âmbito geral, foram introduzidos neste capítulo.

O capítulo 2 apresenta uma revisão da literatura sobre uma visão geral sobre o potencial de biodegradação de hidrocarbonetos; produção de biossurfactante ramnolipídeo e polímeros de polihidroxialcanoatos são apresentados no Capítulo 2. Nesse, a ênfase é dada à revisão de literatura, para a discussão da aplicação dos ramnolipídeos e sua produção simultânea com os polímeros de polihidroxialcanoato.

No Capítulo 3 são apresentados os resultados e detalhes da pesquisa sobre a análise da diversidade molecular da população de bactérias isoladas do sedimento da zona costeira da praia de Suape, por meio da região 16S do rDNA. Ensaio de aclimação dos micro-organismos, degradação do hidrocarboneto poliaromático naftaleno e caracterização do sedimento podem ser observados nesse capítulo.

O Capítulo 4 descreve o experimento sobre a produção simultânea do biossurfactante ramnolipídeo, secretado extracelularmente, e o polímero polihidroxialcanoato, acumulado intracelularmente, produzidos a partir do glicerol, resíduo da fábrica de biodiesel, utilizando estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*, isoladas de poços de petróleo. Neste capítulo é observada, além da produção, a caracterização dos análogos de ramnolipídeo, e ensaios de toxicidade.

Finalmente, o Capítulo 5 contém as considerações finais e conclusões da presente pesquisa.

1.3. REFERÊNCIAS

Anderson, A.J.; Dawes, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiology. Reviews.* v. 54, p. 450-472, 1990.

Araújo, M. C.; Stella, T. S.; Chagas, A. C. O.; Barbosa, S, C, T.; Costa, M, F. Análise da ocupação urbana das praias de Pernambuco, Brasil. *Revista da Gestão Costeira Integrada.* v. 7 (2), p. 97-104, 2007.

Desai, A. J.; Banat, I. M. Microbial production of surfactant and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* v.61, p. 47-64, 1997.

Eckenfelder, W. W. *Industrial Water Pollution Control.* New York. McGraw-Hill Publishing Company. 1989.

Fleck, L. C.; Bicca, F.C.; Ayub, M. A. Physiological aspects of hydrocarbon emulsification, meta resistance and DNA profile of biodegradation bacteria isolated from oil polluted sites. *Biotechnology Letters,* v.22, p. 285-289, 2000.

Koenig, M. L.; Eskinazi-Leça, E.; Neumann- Leitão, S.; Macêdo, S. J. Impactos da construção do porto de Suape sobre a comunidade fitoplancônica no estuário do rio Ipojuca (Pernambuco-Brasil). *Acta Botânica Brasilica.* v. 16 (4), p. 407-420, 2002.

Peel, M. C.; Finlayson, B. L.; McMahon, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences.* v. 11, p. 1633-1644, 2007.

Schippner, C.; Gebner, K.; Muller, T.; Scheper, C. Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. *Journal of Biotechnology,* v.83, p. 189-198, 2000.

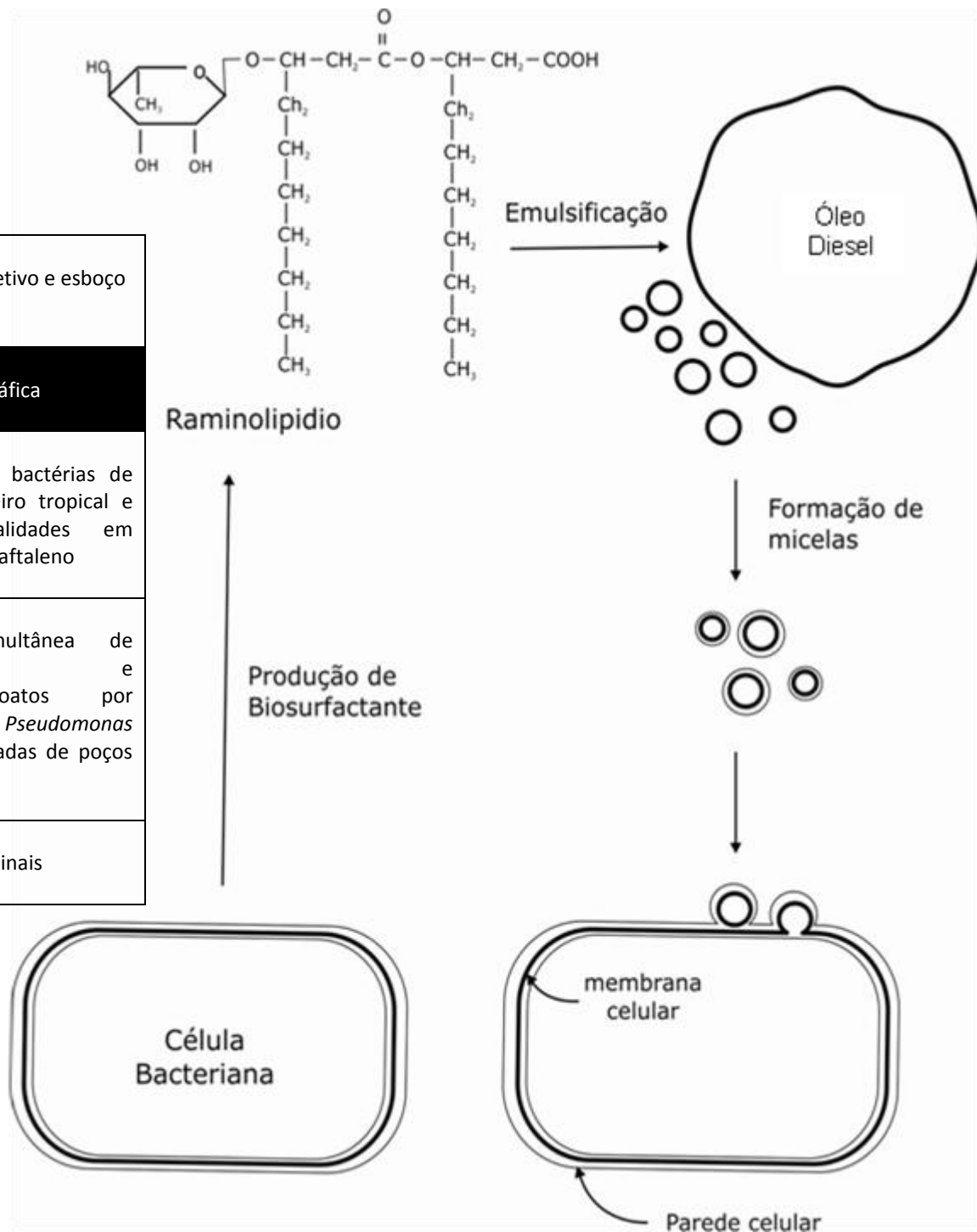
Silva, A. P.; Neumann-Leitão, S.; Schwamborn, R.; Gusmão, L. M. O.; Silva, T. A. Mesozooplankton of an impacted bay in north eastern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and technology*. v. 47 (3), p. 485-493, 2004.

Semple, K.; Reid, B. J.; Fermor, T. R. Impact of contamination strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Review Environmental Pollution*. v. 11, p. 269-283, 2001.

Teódulo, M. J. R.; Lima, E. S.; Neumann, V. H. M. L.; Leite, P. R. B.; Florêncio, L. Comparação de métodos de extração parcial de metais traço em solos e sedimentos de um estuário tropical sob a influência de um complexo industrial portuário, Pernambuco Brasil. *Estudos Geológicos*. v. 13, p. 23-34, 2003.

Ururahy, A.F.P. Biodegradação de resíduo oleoso proveniente de refinaria. 344f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1998.

01	Introdução, objetivo e esboço da tese
02	Revisão Bibliográfica
03	Diversidade de bactérias de ambiente costeiro tropical e suas potencialidades em biodegradar o naftaleno
04	Produção simultânea de ramnolípido e polihidroxicanoatos por estirpes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de poços de petróleo
05	Considerações Finais



2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biorremediação

A poluição provocada por derramamento de óleo causa danos ao meio ambiente e os seus efeitos geram preocupações de ordem pública, requerendo soluções eficazes.

A primeira providência tomada para conter o dano ambiental, por derramamento de óleo, consiste na remoção mecânica e físico-química do material oleoso. Os métodos mecânicos mais utilizados são barreiras de contenção da mancha de óleo e bombas recuperadoras de óleo. O método químico mais aplicado é a adição de surfactantes, que irão emulsionar o óleo, tornando-o mais biodisponível, porém aumentam a dissolução do óleo, podendo afetar a biota bentônica (Nordvik et al., 1996).

A biodegradação de petróleo e derivados pode ser limitada pela sorção dos compostos aos componentes do sedimento. O sucesso da biorremediação depende da disponibilidade de micro-organismos hidrocarbonoclásticos (Paudyn et al., 2008). A sua caracterização dos micro-organismos hidrocarbonoclásticos em ambientes naturais fornece parâmetros para o processo de bioestimulação e biorremediação *in situ*, podendo ser adicionados no processo para melhoria do potencial de biodegradação (Van Hamme et al., 2003).

A produção de biosurfactante é uma das vias utilizadas pelos micro-organismos hidrocarbonoclásticos auxiliando na disponibilidade de hidrocarbonetos à célula microbiana através das emulsões (Mulligan et al., 2001). Esta tecnologia apresenta determinadas vantagens quando comparada com a remediação convencional, tais como: emprega sistemas biológicos que demandam um custo relativamente baixo; elimina permanentemente os resíduos; pode ser realizada no local; evita gasto com transporte de material contaminado e pode ser acoplada a outras técnicas de tratamento (Baker e Herson, 1994).

Os biosurfactantes produzidos por micro-organismos facilitam a formação de microemulsões, espumas, emulsificação e dispersão de partículas. A porção hidrofóbica (apolar) é uma região formada por uma cadeia de hidrocarbonetos de um ácido graxo, enquanto que a porção hidrofílica (polar) deriva de grupos éster ou álcool de lipídeos neutros. São biodegradáveis no ambiente e apresentam baixa toxicidade, sendo capazes de reduzir a tensão superficial, facilitando as interações entre os hidrocarbonetos e a

célula microbiana, propiciando o aumento da área interfacial (Desai et al., 1988; Mulligan et al. 2001).

2.2. Surfactantes

Surfactantes são moléculas anfifílicas, ou seja, apresentam em sua composição uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica. A fração apolar, hidrofóbica, é constituída por uma cadeia de hidrocarbonetos, enquanto que a fração polar pode apresentar diferentes componentes (Georgiou et al., 1992).

A grande maioria dos surfactantes comerciais é derivada do petróleo. Entretanto, o aumento das preocupações com o meio ambiente tem aumentado o interesse em biossurfactantes de origem microbiana, que apresentam características como baixa toxicidade e a possibilidade de produção utilizando substratos renováveis, além da tolerância à temperatura, pH, força iônica e de serem biodegradáveis (Lin et al., 1994; Banat et al., 2000; Makkar e Cameotra, 2002).

2.3. Biossurfactantes

Biossurfactantes são metabólitos secundários, anfifílicos complexos, com propriedades de reduzir a tensão superficial, interfacial e são sintetizados por uma ampla variedade de micro-organismos (Benincasa et al., 2004). Os micro-organismos, como *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, produzem biossurfactantes com a finalidade fisiológica de crescimento em substratos hidrofóbicos, tornando-os disponíveis para ao metabolismo microbiano (Nitschke et al., 2005).

A quantidade, qualidade e o tipo do biossurfactante são influenciados pela fonte de carbono disponível, disponibilidade de nutrientes e condições de cultura, como: pH, temperatura, agitação, oxigenação e taxa de diluição (Banat, 1995).

Dentre os compostos que apresentam propriedades tensoativas e que são sintetizados por organismos vivos, pode-se destacar os sintetizados por vegetais (saponinas), por micro-organismos (glicolipídeos) e até pelo organismo humano (saís biliares), sendo os mesmos considerados surfactantes naturais (Nitschke e Pastore, 2002).

Dentre os biossurfactantes, o grupo mais conhecido é o do glicolipídeos, que consiste de carboidratos combinados com ácidos alifáticos ou hidroxialifáticos de cadeia

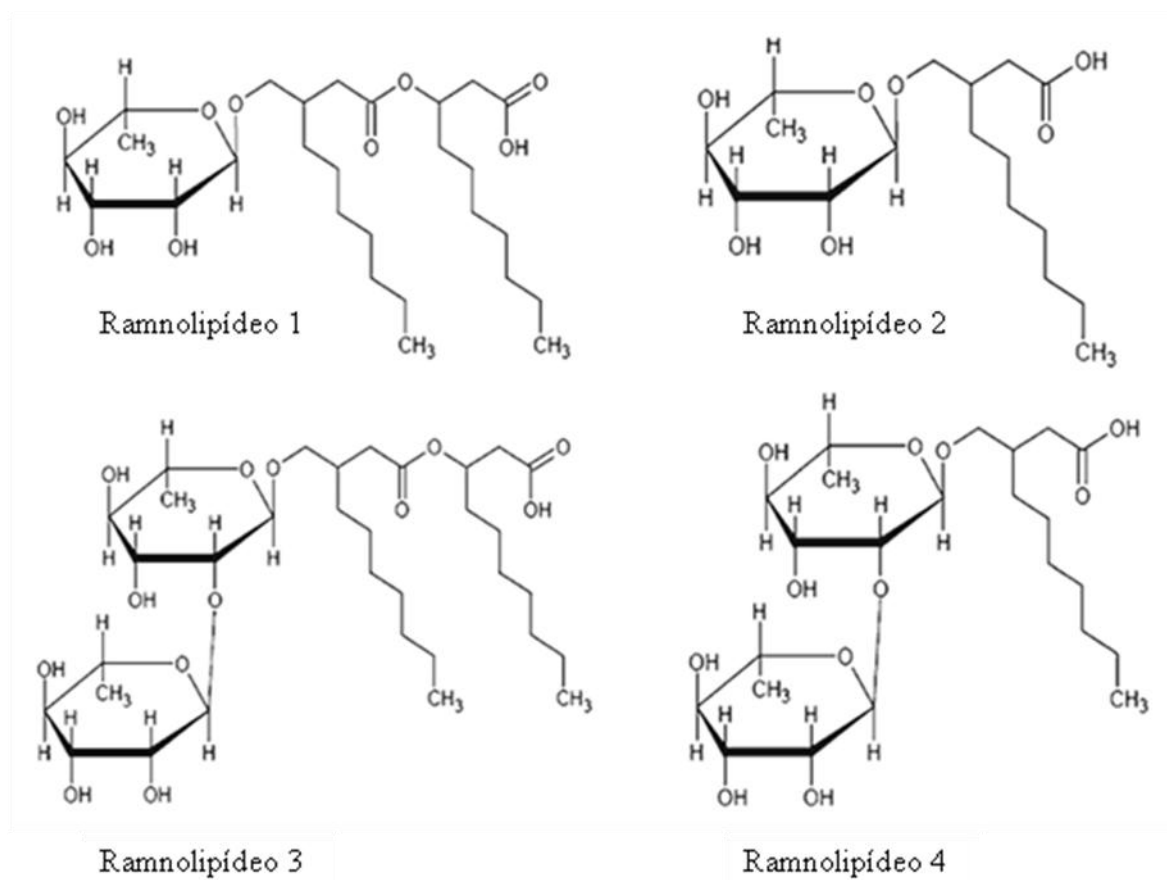
longa. Entre os glicolipídeos, os mais investigados são os ramnolipídeos, os trealolipídeos e os soforolipídeos (Desai e Banat, 1997).

2.4. Ramnolipídeos

Os ramnolipídeos pertencem à classe dos glicolipídeos, que são os biossurfactantes mais bem conhecidos (Desai e Banat, 1997; Ron e Rosenberg, 2002).

Os biossurfactantes da classe dos ramnolipídeos são constituídos por uma ou duas moléculas de raminose associados a uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico (Figura 3). Foram descritos pela primeira vez em *Pseudomonas pyocyanea*, atual *Pseudomonas aeruginosa*, cultivada com glicose como fonte de carbono (Desai e Banat, 1997).

Figura 3: Estrutura dos ramnolipídeos. Ramnolipídeo 1: mono-ramno-di-lipídeo; Ramnolipídeo 2: mono-ramno-mono-lipídeo; Ramnolipídeo 3: di-ramno-di-lipídeo; Ramnolipídeo 4: di-ramno-mono-lipídeo. Fonte: Amani et al., (2013).



Ramnolipídeos, soforolipídeos e surfactina estão entre os três biossurfactantes disponíveis comercialmente. No entanto, apenas o ramnolipídeo é aprovado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos para aplicação industrial (Nitschke e Costa, 2007). A principal dificuldade para sua ampla utilização é o elevado custo de produção, estimado em dez vezes mais que os surfactantes químicos (Nitschke e Costa, 2010; Reis et al., 2011).

2.4.1. Aplicação dos ramnolipídeos no tratamento de petroderivados

Algumas aplicações têm sido atribuídas aos biossurfactantes, como a biorremediação de hidrocarbonetos (Banat, 1995; O'Connor, 2002) e aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica (Banat et al., 2000). Em processo de biorremediação, os ramnolipídeos foram utilizados, com sucesso, na remoção do óleo no cascalho contaminado no acidente com o navio Exxon Valdez no Alasca (Desai e Banat, 1997).

A utilização do ramnolipídeo, como pré-tratamento de solo contaminado com hidrocarbonetos, aumenta a disponibilidade destes compostos para o consórcio microbiano utilizado no processo de biorremediação (Rahman et al. 2003). Guo-Liang et al. (2005) observaram que a adição de ramnolipídeos auxiliou na degradação do petróleo, por *Pseudomonas aeruginosa*, com valores superiores a 58%. Para Urum et al. (2004), a utilização de ramnolipídeos e do surfactante sintético dodecil-sulfato de sódio (SDS) foi considerada dentro da mesma faixa de reprodutibilidade experimental para a remoção de petróleo de amostras de solo.

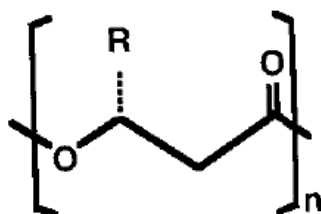
Quando comparado com o surfactante químico Corexit[®], com uma característica aniônica semelhante a dos ramnolipídeos, este apresentou toxicidade 10 vezes superior a do ramnolipídeo (Santa Anna et al., 2002; Santa Anna et al., 2007).

Para Bai et al. (1997), a utilização de uma solução de ramnolipídeos aumentou a eficiência da lavagem de uma coluna de areia impactada com hexadecano. Noordman et al. (2002) observaram que a adição do ramnolipídeo aumentou a degradação do hexadecano, por uma estirpe de *Pseudomonas aeruginosa*, a um nível maior do que qualquer surfactante químico, sugerindo que os ramnolipídeos estimulam a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo.

2.5. Polihidroxicanoatos (PHAs)

Polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres lineares compostos por monômeros 3-hidroxi (Figura 4), insolúveis em água, biodegradáveis. São armazenados na célula bacteriana na forma de inclusões citoplasmáticas, com diâmetros médios de 0,2-0,5 µm; funcionando como reserva de carbono e energia. Chegam a representar até 80% da massa celular bacteriana (Anderson e Dawes, 1990; Madison e Huisman, 1999; Du et al., 2001; Kim e Lenz, 2001).

Figura 4: Estrutura linear de PHAs. Fonte: Madison e Huisman (1999).



Existem aproximadamente 150 monômeros de PHAs produzidos por bactérias, divididos em dois grupos: os monômeros de cadeia média, que apresentam seis a dezesseis átomos de carbono na cadeia principal; e os de cadeia curta que apresentam três a cinco átomos de carbono na cadeia principal (Madison e Huisman, 1999).

Diversos micro-organismos são conhecidos como produtores de PHAs, dentre eles: *Pseudomonas aeruginosa* (Hori et al., 2002; Pham et al., 2004); *Cupriavidus necator* (Vandamme e Coenye, 2004); *Bacillus megaterium* (Reddy et al., 2003); *Aeromonas caviae* (Fukui et al., 1997), dentre outros.

Dentre os micro-organismos produtores de PHA, o gênero *Pseudomonas* destaca-se pela sua incapacidade em produzir PHAs de cadeia curta, como o poli-3-hidroxiбутирато (PHB) (Sudesh et al., 2000). Entretanto, é capaz de produzir altos índices de PHAs quando submetido a uma grande diversidade de fontes de carbono (Steinbuchel e Lutke-Eversloh, 2003).

Os PHAs são produtos promissores para a confecção de embalagens plásticas, podendo substituir polímeros sintéticos, como o polietileno (Weiner, 1997; Yu, 2001). Diferem dos polímeros quimiossintéticos, como o polietileno, pela fácil biodegradabilidade e síntese a partir de fontes de carbono renováveis (Madison e Huisman, 1999). Foram inicialmente utilizados para a produção de garrafas, filmes e

fibras para embalagens biodegradáveis; podem ser aplicados como matriz em materiais retardantes para a liberação de herbicidas, inseticidas e ainda apresentam potenciais para aplicações terapêuticas na forma de sais de sódio como anestésico (Steinbüchel e Fächtenbusch, 1998; Sudesh et al., 2000).

Na natureza, diversos micro-organismos apresentam potencial para degradar PHAs pelo uso de PHA hidrolases e PHA despolimerases. As atividades destas enzimas podem variar de acordo com a composição do polímero e das condições ambientais (Madison e Huisman, 1999).

A utilização de PHAs como substituto de plásticos derivados de petróleo depende da capacidade de se produzir poliésteres a custos competitivos, já que apresentam valores superiores aos plásticos quimiossintéticos, sendo comercializados por até cinco vezes mais, quando comparados aos plásticos sintéticos (Sim, et al., 1997; Suriyamongkol et al., 2007). No entanto, é necessário que o micro-organismo produza altas concentrações de PHA; utilizem substratos de baixo custo e apresentem um alto fator de conversão de substrato em PHA (Ramsay et al., 1991).

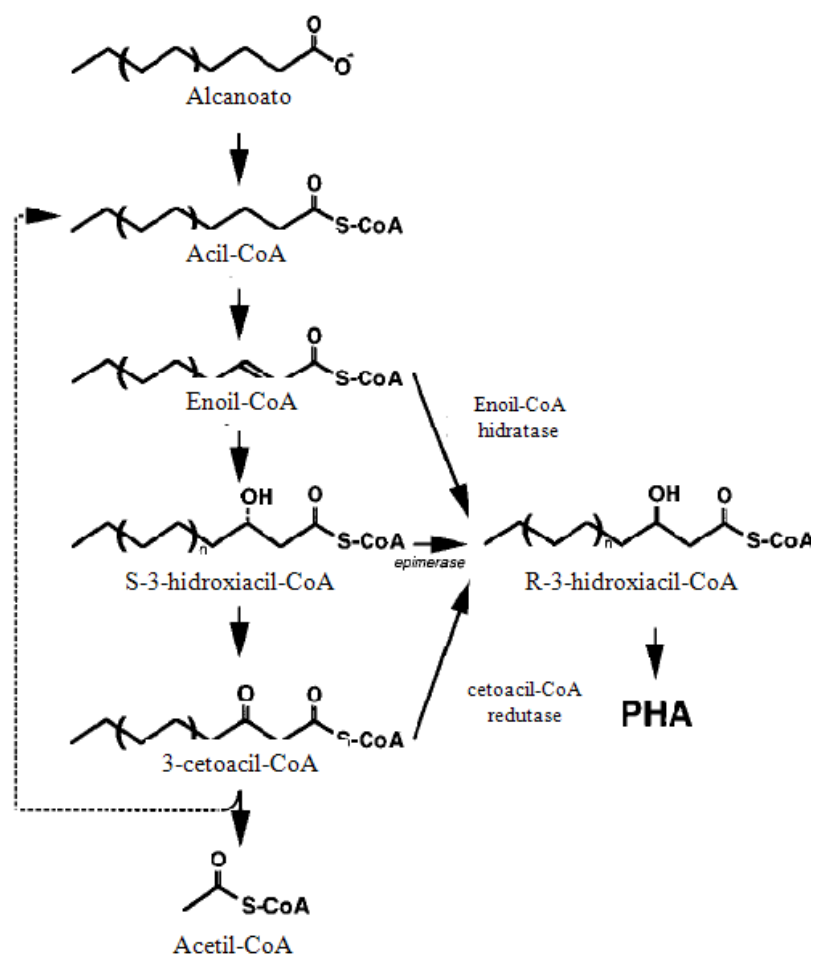
2.6. Biossíntese de PHAs por *Pseudomonas*

Pseudomonas spp. podem produzir polihidroxialcanoatos quando cultivadas em diferentes fontes do carbono, onde sua composição poderá variar de acordo com a fonte do carbono empregada (Anderson e Dawes, 1990; Lee, 1996).

A síntese de PHAs depende da fonte de carbono disponível e pode seguir duas rotas: a biotransformação biossinteticamente dirigida, quando são fornecidos ácidos carboxílicos como fonte de carbono; e a biotransformação xenobiótica, quando empregados açúcares, acetato e glicerol, como fonte de carbono. Na biotransformação xenobiótica, o substrato é metabolizado em acetil-CoA (Madison e Huisman, 1999).

A composição e a estrutura dos PHAs sugerem que sua via metabólica é uma ramificação direta da via de oxidação de ácidos graxos. Nesta via, os ácidos são ativados por uma tioquinase e são degradados via β -oxidação, resultando na formação de acetil-CoA (Figura 5). Uma coenzima tioéster de um ácido 3-cetoalcanóico, com quatro ou mais átomos de carbono, é reduzida ao correspondente tioéster R-3-hidroxiacil-CoA, por uma 3-cetoacil-CoA redutase (Figura 3) (Lageveen et al., 1988; Huisman et al., 1989).

Figura 5: Biossíntese de PHAs por *Pseudomonas*. Fonte: Madison e Huisman (1999).



2.7. Produção simultânea de ramnolipídeos e polihidroxialcanoatos

Rhamnolipídeos (RL) e polihidroxialcanoatos (PHA), são produzidos por espécies de *Pseudomonas*, apresentam uma ampla potencialidade de aplicações industriais e ambientais. A principal vantagem dos RL e PHA são suas propriedades biodegradáveis e potencialidades de substituição de detergentes químicos e plásticos, respectivamente. No entanto, uma desvantagem para a sua utilização é atribuída ao custo de produção e informações fidedignas sobre sua toxicidade (Nitschke et al., 2011).

A produção de RL e PHA é bem estudada. No entanto, sua produção simultânea ainda é pouco evidenciada. A produção concomitante dos RL e PHA torna-se viável, pois os RL são secretados pelas células durante o seu processo de produção antes da fase de extração dos PHAs, que são encontrados de forma intracelular, sendo necessária

a quebra da parede celular para que haja sua liberação (Hori et al., 2002; Marsudi et al., 2008).

Hori et al. (2002); Pham et al. (2004) e Marsudi et al. (2008) ao avaliarem a biossíntese do RL e PHA, utilizando diferentes fontes de carbono, puderam observar que a produção simultânea desses dois metabólitos era uma estratégia eficaz e passível de ser realizada, onde se evidenciavam bons rendimentos. No entanto, o tipo da fonte de carbono afetava a composição dos monômeros de PHAs e os homólogos de RL.

A utilização de micro-organismos que produzam altas concentrações de RL e PHA, que assimilem substratos de baixo custo e apresentem um alto fator de conversão de substrato em PHA; e que, associados a melhorias na eficiência de produção, são estratégias que devem ser consideradas para uma maior redução dos custos na produção simultânea desses compostos.

2.8. REFERÊNCIAS

- Amani, H.; Müller, M. M.; Sylđatk, C.; Hausmann, R. Production of microbial rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* MM1011 for ex situ enhanced oil recovery. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 170 (5), p. 1080-1083, 2013.
- Anderson, A. J.; Dawes, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiology. Reviews*. v. 54, p. 450-472, 1990.
- Bai, G.; Brusseau, M. L.; Miller, R. M., Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. *Journal of Contaminant Hydrology*. v. 25 (1-2), p.157-170, 1997.
- Baker, K. H.; Herson, D. S. Microbiology and biodegradation. In: Baker, K. H.; Herson, D. S. *Bioremediation*. Me Graw Hill, Inc. USA. p.11-60, 1994.
- Banat, I. M.; Makkar, R. S.; Cameotra, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology Biotechnology*. v.53 (5), p. 495-508, 2000.
- Banat, I. M. Biosurfactants production and possible use in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. *Bioresource Technology*. v. 51 (1), p. 1-12, 1995.
- Benincasa, M.; Abalos, A.; Oliveira, I; Manresa, A. Chemical structure, surface properties and biological actives of the biosurfactante produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antoniie Van Leeuwenhoek*. v. 85, p. 1-8, 2004.
- Desai, A. J.; Banat, I. M. Microbial production of surfactant and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v.61 (1), p.47-64, 1997.

Desai, A. J.; Patel, K. M.; Desai, J. D. Emulsifier production by *Pseudomonas fluorescens* during the growth on hydrocarbons. *Current Science*. v.57, p.500-5001, 1988.

Du, G. C.; Chen, J.; Yu, J.; Lun, S. Continuous production of poly-3- hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system. *Journal of Biotechnology*. v.88, p.59-65, 2001.

Fukui, T.; Doi, Y. Cloning and analysis of the poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. *Journal Bacteriology*. v. 179 (15), p. 4821-4830, 1997.

Georgiou, G.; Lin, S.; Sharma, M. M. Surface-active compounds from microorganisms. *Biotechnology*. v.10 (1), p.60-65, 1992.

Guo-Liang, Z.; Yue-Ting, W.; Xin-Ping, Q.; Meng, Q. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *Journal of Zhejiang University Science B*. v. 6 (8), p. 725-730, 2005.

Hori, K.; Marsudi, S.; Unno, H. Simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnology Bioengineering*. v. 78 (6) p.699-707, 2002.

Huisman, G. W. O.; Wonink, E.; Koning, G.; Preusting, H.; Withold, B. Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 55, p. 1949-1954, 1989.

Kim, Y. B.; Lenz, R. W. Polyesters from microorganisms. *Advances in biochemical Engineering Biotechnology*. v. 71, p. 51-79, 2001.

Lageveen, R. G.; Huisman, G. W.; Preusting, H.; Ketelaar, P.; Eggink, G.; Witholt, B. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly(R)-3-hydroxyalkanoates and poly(R)-3- hydroxyalkenoates. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 54 (12), p. 2924-2932, 1988.

Lee, S. Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*. v. 14 (11), p. 431-438, 1996.

Lin, S. C.; Carswell, K. S.; Sharma, M. M.; Georgiou, G. Continuous production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2. *Applied Microbiology Biotechnology*. v.41(3), p. 281-285.1994.

Madison, L. L.; Huisman, G. W. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 63 (1), p. 21-53, 1999.

Makkar, R. S.; Cameotra, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied Microbiology Biotechnology*. v. 58 (4), p. 428-434, 2002.

Marsudi, S.; Unno, H.; Hori, K. Palm oil utilization for the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology Biotechnology*. v. 78, p. 955-961, 2008.

Mulligan, C. N.; Yong, R. N.; Gibbs, B. F. Surfactante-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*. v. 60, p. 371-380, 2001.

Nitschke, M.; Costa, S.G.V.A.O. Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science and Technology*. v. 18 (5), p. 252-259, 2007.

Nitschke, M.; Costa, S.G.V.A.O.; Contiero, J. Structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 160 (7), p. 2066-2074, 2010.

Nitschke, M.; Costa, S.G.V.A.O.; Contiero, J. Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest. *Process Biochemistry*. v. 46, p.621–630, 2011.

Nitschke, M.; Costa, S.G.V.A.O.; Haddad, R.; Gonçalves, L.A.G.; Eberlin, M.; Contiero, J. Oil waste as unconventional substrate for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. *Biotechnological Progress*. v. 21, p.1562-1566, 2005.

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

Noordman, W. H.; Wachter, J. H. J.; BOER, G. J.; Janssen, D. B. The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability. *Journal of Biotechnology*. v. 94 (2), p. 195-212, 2002.

Nordvirk, A. B.; Simmons, J. L.; Bitting, K. R.; Lewis, A.; Strom-Kristiasen, T. Oil and water separations in marine oil spill clean-up operations. *Spill Science and Technology Bulletin*. v. 3 (3), p. 107-122, 1996.

O’Connor, L. Market forecast: microbial biosurfactants. *Industrial Bioprocessing*.v. 24, p. 10-11, 2002.

Paudyn, K.; Rutter, A.; Rowe, R. K.; Poland, J. S. Remediation of hydrocarbon contaminated soils in the Canadian arctic by landfarming. *Cold Regions Science and Technology*. v. 53 (1), p.102-114, 2008.

Pham, T. H.; Webb, J. S.; Rehm, B. H. A. The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiology*. v. 150, p. 3405–3413, 2004.

Rahman, K. S. M.; Rahman, T. J.; Kourkoutas, Y.; Petsas, I.; Marchant, R.; Banat, I. M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology*. v. 90 (2), p. 159-168, 2003.

Ramsay, B. A.; Saracovan, I.; Ramsay, J. A.; Marchessault, R. H. Continuous production of long-side-chain poly-3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas oleovorans*. *Applied Environmental Microbiology*. v. 58 (2), p. 744-746, 1991.

Reddy, C. S. K.; Rashmi, R. G.; Kalia, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an Overview. *Bioresource Technology*. v. 87, p. 137-146, 2003.

Reis, R. S.; Pereira, A.G.; Neves, B.C.; Freire, D.M. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* - a review. *Bioresource Technology*. v. 102 (11), p. 6377-6384, 2011.

Ron, E. Z.; Rosenberg, E. Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 13 (3), p. 249-252. 2002.

Santa Anna, L. M.; Sebastian, G. V.; Menezes, E. P.; Alves, T. L. M.; Santos, A. S.; Pereira-Jr, N.; Freire, D. M. G. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. *Brazilian Journal of chemistry Engineering*. v. 19, p.159-166, 2002.

Santa Anna, L. M. M.; Soriano, A. U.; Gomes, A. C.; Menezes, E. M.; Gutarra, M. L.; Freire, D. M. G.; Pereira-Jr, N. Use of biosurfactant in the removal of oil from contaminated sandy soil. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* v. 82 (7), p. 687-691, 2007.

Sim, L.; Ward, O. P.; Li, Z. Y. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*. v. 19 (4), p.232-8, 1997.

Steinbüchel, A.; Fuchtenbusch, B. Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends in Biotechnology*, v. 16(10), p. 419-427, 1998.

Steinbüchel, A.; Lutke-Eversloh, T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*. v. 16, p. 81-96, 2003.

Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxialkanoates biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. v. 25 (10), p. 1503-1555, 2000.

Suriyamongkol, P.; Weselake, R.; Narine, S.; Moloney, M.; Shah, S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - a review. *Biotechnology Advances*. v.25, p.148-175, 2007.

Urum, K.; Pekdemir, T.; Copur, M. Surfactants treatment of crude oil contaminated soils. *Journal of Colloid and Interface Science*. v. 276 (2), p. 456-464, 2004.

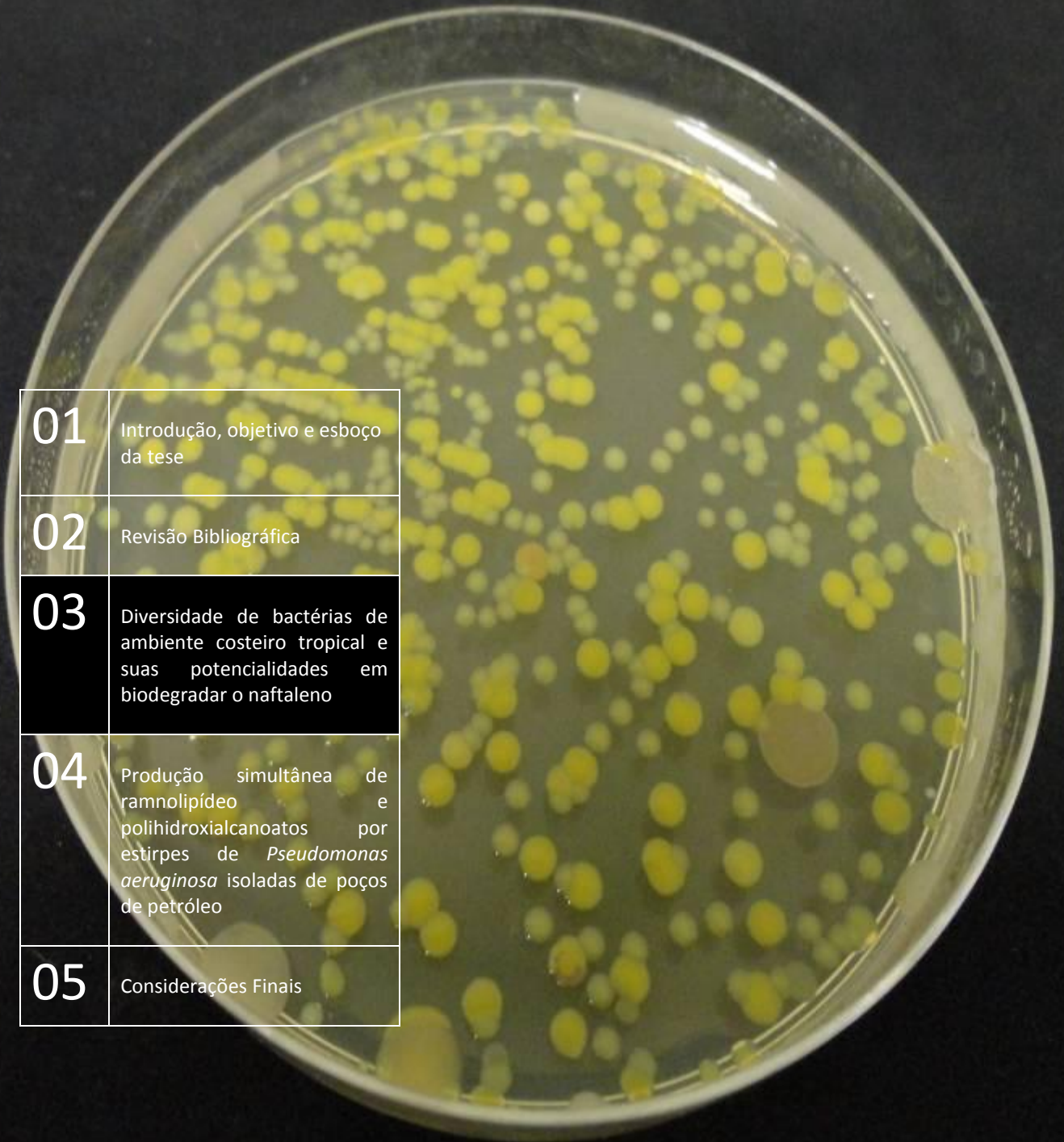
Van Hamme, J D; Singh, A; Ward, O P. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v.9, p.503-549, 2003.

Vandamme, P.; Coenye, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 54 (6), p. 2285-2289, 2004.

Weiner, R. M. Biopolymer from marine prokaryotes. *Trends in Biotechnology*, v. 15 (10), p. 390- 394, 1997.

Yu, J. Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. *Journal of Biotechnology*. v. 86 (2), p. 105-112, 2001.

01	Introdução, objetivo e esboço da tese
02	Revisão Bibliográfica
03	Diversidade de bactérias de ambiente costeiro tropical e suas potencialidades em biodegradar o naftaleno
04	Produção simultânea de ramnolipídeo e polihidroxialcanoatos por estirpes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de poços de petróleo
05	Considerações Finais



Manuscrito 1:

**Diversidade de bactérias de ambiente costeiro tropical
e suas potencialidades em biodegradar o naftaleno**

Diversidade de bactérias de ambiente costeiro tropical e suas potencialidades em biodegradar o naftaleno

RESUMO

Acidentes causados por petróleo e derivados representam um grave problema ambiental devido à persistência e difícil assimilação da maioria dos compostos químicos complexos, em especial os hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA). O potencial de derrame de HPAs na bacia de Suape é considerado realista devido ao complexo portuário industrial em franco desenvolvimento e, particularmente, devido à nova refinaria de óleo diesel aí instalado. Neste trabalho, o objetivo foi analisar o potencial de biodegradação de um dos mais importantes HPAs, o naftaleno e do seu principal metabólito de degradação, o catecol, por bactérias isoladas das areias da praia de Suape (PE). Foram realizadas, inicialmente, análises de granulometria e fertilidade do sedimento arenoso da praia. Posteriormente, foi procedido o enriquecimento e a aclimação dos micro-organismos endógenos e a identificação da diversidade bacteriana, baseada na pesquisa de genes, utilizando 16S rDNA, usando naftaleno dioxigenase (nahAc), catecol 1,2-dioxigenase e catecol 2,3-dioxigenase como biomarcadores. Os resultados mostraram que as bactérias encontradas na areia da praia de Suape, pertencem aos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Cellulomonas* e *Arthrobacter*. Esses micro-organismos são tolerantes ao naftaleno em concentrações de até 30 mg/ L. No entanto, não apresentam capacidade genética para degradá-lo, assim como ao catecol. Esses resultados fornecem uma melhor compreensão da biodiversidade das bactérias naturais de ambiente arenoso com potencial biodegradante para HPAs, podendo se valer de estratégias para possíveis medidas de remediação em caso de acidentes.

Palavras-chave: Ambiente salino; rDNA; hidrocarbonetos; catecol; biorremediação.

ABSTRACT

Accidents caused by oil and oil products constitute a serious environmental problem due to persistent and difficult to assimilate most complex chemical compounds, particularly the polyaromatic hydrocarbons (PAH). In this work, the objective was to analyze the potential for biodegradation of one of the most important PAHs, naphthalene and its major metabolite degradation, catechol, by bacteria isolated from beach sand Suape (PE). The potential for spillage of PAHs in the basin is considered realistic Suape port complex due to the rapidly developing industrial and particularly due to the new refinery diesel installed. Were initially performed analyzes of particle size and fertility of sandy sediment from the beach; later, enrichment and acclimation of microorganisms and identification of endogenous bacterial diversity using 16S rDNA, as naphthalene dioxygenase (nahAc), catechol 1,2-dioxygenase and catechol 2,3-dioxygenase as biomarkers. The results showed that among the bacteria found in the sand of Suape, belong to the genera *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Cellulomonas*, and *Arthrobacter*. These microorganisms are tolerant to naphthalene at concentrations of up to 30 mg/ L, however, does not have the genetic capacity to bioremediate, so as to catechol. These results provide a better understanding of the biodiversity of the natural bacteria sandy environment with potential for biodegradante PAHs can avail themselves of strategies for possible remediation measures in case of accidents.

Keywords: Saline environment; rDNA; hydrocarbons; catechol; bioremediation.

3.1. INTRODUÇÃO

Acidentes por petróleo e derivados representam um problema de interesse público devido à persistência e recalcitrância dos seus compostos no meio ambiente, acarretando danos aos meios físico, químico e biológico. Exemplos desses compostos são os hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA).

A utilização de organismos para o tratamento de ambientes poluídos por petróleo e derivados já é bem conhecida. Caracteriza-se pela recuperação de ambientes contaminados por petroderivados, convertendo-os em substâncias mais simples, tornando-se uma ferramenta viável quando a área contaminada possuir uma grande extensão e volume (Cammarota e Freire, 2006; Fang e Barcelona, 2003).

A diversidade microbiana adaptada a ambientes salinos, de clima quente e úmido, com capacidade de biodegradar compostos xenobióticos é pouco explorada. São escassos os relatos de biodegradação em ambientes costeiros tropicais, em especial nas praias (Del'Arco e França, 1999; Del'Arco e França, 2001; Santa Anna, et al. 2007). Um pouco mais frequentes são os estudos em ambientes de manguezal (Celino e Queiroz, 2006; Celino et al., 2008; Moreira et al., 2011; Lima et al., 2012; Moreira et al., 2013).

No Brasil, o primeiro episódio de derramamento de óleo ocorreu em 1974 quando o petroleiro *Takimya Maru* chocou-se com uma rocha no Canal de São Sebastião, litoral norte do Estado de São Paulo, causando um vazamento aproximado de 6000 toneladas de óleo (Poffo, 2000). Em junho de 2000, um oleoduto rompeu na Refinaria Getúlio Vargas, no Estado do Paraná, e quatro milhões de litros de óleo cru vazaram contaminando os recursos hídricos (Araruma al., 2004).

A baía de Todos os Santos, localizada no Estado da Bahia, sofreu na segunda metade do século XX, inúmeros acidentes ambientais envolvendo derrames de óleo (Celino e Queiroz, 2006). Outros eventos, envolvendo a liberação de óleo ao mar, também ocorreram no litoral de outros estados brasileiros, mas não foi possível encontrar um registro histórico organizado em um banco de dados nacional (Poffo, 2000).

A baía de Suape está localizada na costa Sul do Estado de Pernambuco, entre as coordenadas 8°15' e 8°30' S e entre 34°55' e 35°05' W. Está situada na faixa intertropical de clima quente e úmido do tipo Aw', segundo a classificação de Köppen, com massas de ar equatorial e tropical. A temperatura média anual é de 24°C, a

umidade relativa média anual é superior a 80% e o regime pluviométrico varia entre 1850 e 2364 mm, concentrado nos meses de março a agosto (Koenig et al., 2002; Teódulo et al., 2003; Silva et al., 2004; Peel et al., 2007).

Em 1980 um complexo portuário industrial foi construído na baía de Suape (Silva et al., 2004) e em 2010 uma refinaria de petróleo teve sua construção iniciada e estará em operação a partir de 2013. Assim, o risco de derrame de óleo e seus componentes, como os HPAs, na baía de Suape, é considerado realista.

No Brasil, poucos estudos foram conduzidos em campos de produção e refino de petróleo e derivados (Celino et al., 2008). Baseado nesse aspecto, este trabalho teve como objetivo analisar o potencial de biodegradação do naftaleno e do catecol, principal metabólito da degradação do naftaleno, por bactérias isoladas da areia da praia de Suape. Os resultados obtidos visam fornecer uma melhor compreensão da biodiversidade das bactérias com potencial biodegradante para HPAs, podendo se valer de estratégias para possíveis medidas de remediação em caso de acidentes.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Sítios de coleta

As amostras de areias foram coletadas na praia de Suape, Pernambuco, Brasil, (Figura 6) durante a baixamar da maré de sizígia. Cerca de 300 g de solo arenoso superficial foram coletados em cada ponto, na camada de 0-15 cm de profundidade, em uma amostra composta por 20 sub-amostras. As sub-amostras foram homogeneizadas, quarteadas, condicionadas em sacos plásticos de poliestireno, mantidas em caixas térmicas e transportadas ao laboratório de Saneamento Ambiental (LSA), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e refrigeradas a 4° C até o momento da análise.

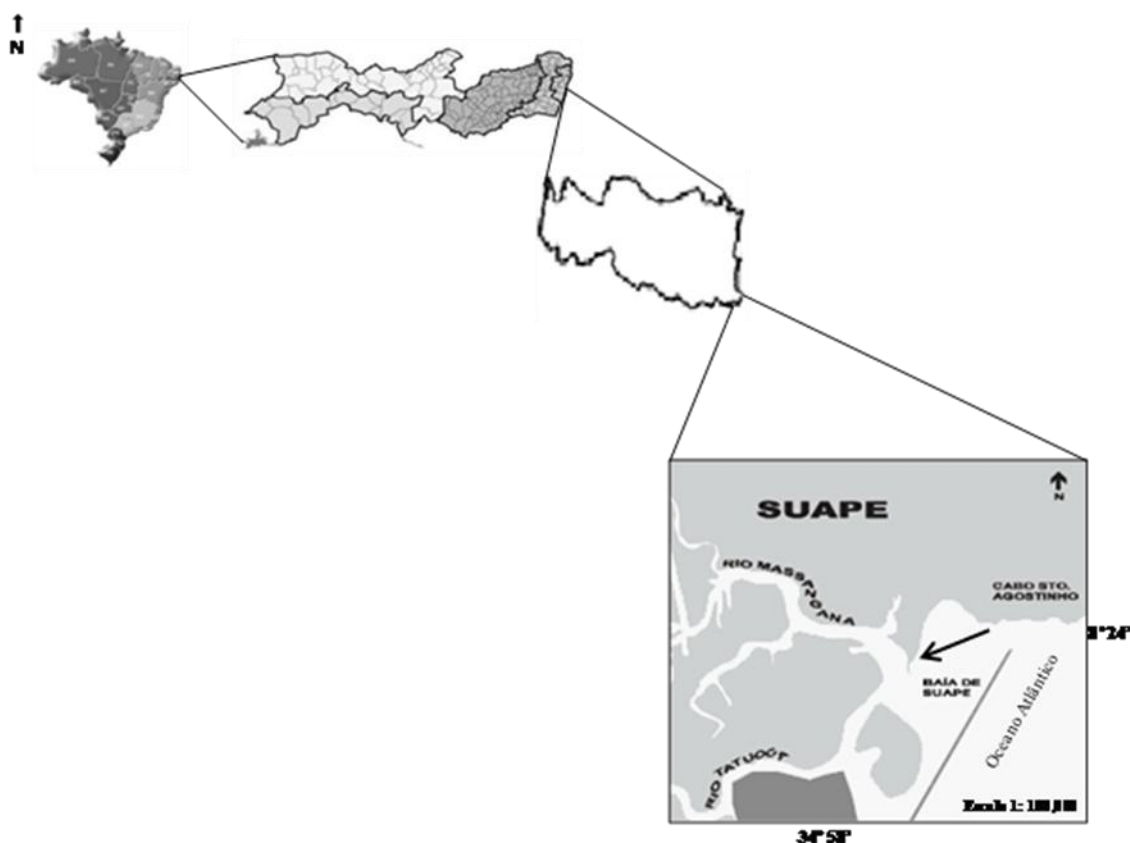
3.2.2. Análise do solo

Frações de solo foram secas em estufa a 105 °C, durante 24 h, e peneiradas em malhas superiores a 2000 µm para remoção de cascalhos, de acordo com o que se preconiza a ABNT/NBR 6502/95. A classificação das partículas de areia seguiu a descrição de Flemming (2000), restrita para sedimentos compostos por grãos de

tamanho $\geq 2000 \mu\text{m}$. O diâmetro de 50 % das partículas (d_{50}) $\leq 1000 \mu\text{m}$ foi determinado pelo Mastersizer Hydro 2000G – Malvern, 60” em ultrassom com índice de refração de partículas de 1450.

A análise do solo foi determinada segundo a metodologia da EMBRAPA (1997). Foram determinados: pH, nitrogênio total, fósforo total, potássio, cálcio, magnésio, enxofre e matéria orgânica total.

Figura 6: Localização da área de estudo na região litorânea do Estado de Pernambuco, município do Cabo de Santo Agostinho, enfocando o local de coleta (marcado por uma seta). Fonte: Adaptado de Koenig et al. (2002).



3.2.3. Reagente e solução

Foi utilizado o hidrocarboneto poliaromático naftaleno (Sigma-Aldrich, Alemanha), com grau de pureza $\geq 99 \%$, sem purificação adicional. A fórmula molecular, massa molecular, solubilidade em água, pontos de fusão e ebulição são: C_{10}H_8 ; 128,18 g; 32 mg/L; 79,5-81° C; 218 °C, respectivamente.

Para preparar a solução estoque primária do poluente orgânico naftaleno, o pó de cristais foi dissolvido em metanol (pureza superior a 99 %) e preservado em

refrigeração a -20° C (Ya-Hui et al., 2010). Um volume desejado de solução estoque foi misturado ao meio de cultura. O volume final de metanol em cada solução deve ser inferior a 0,2 % (Wauchope et al. 1983), para não causar toxicidade aos micro-organismos.

3.2.4. Enriquecimento das culturas para o isolamento e condições de crescimento

As amostras foram inicialmente submetidas à aclimação e enriquecimento. Para a aclimação, 50 g de solo foram adicionados em frascos de borosilicato de 500 mL a 180g, contendo 50 mL de meio líquido de Bushnell-Hass (BH), com a seguinte composição química: H_2PO_4 (1g), K_2HPO_4 (1g), NH_4NO_3 (1g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2g), FeCl_3 (0,05g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,02g), água destilada (1L) (Atlas, 1995). A concentração de naftaleno foi variada, progressivamente, entre 1 mg/L a 30 mg/L. Cada concentração crescente de aclimação ao naftaleno foi incubada em intervalos de 7 dias para as concentrações de: 1 mg/L; 2 mg/L; 5 mg/L; 10 mg/L; 20 mg/L e 30 mg/L.

O enriquecimento foi realizado no mesmo frasco da aclimação, pela inoculação de suplementação de 0,1% (w/v) de glicose (T1); glicerol (T2) e glicose mais glicerol (T3), a 30°C, perfazendo três tratamentos. Foi realizado um controle sem o acréscimo de qualquer suplementação, onde os frascos continham apenas o solo, o meio de BH e o naftaleno, na concentração de 1 mg/L (T4), totalizando quatro tratamentos. As bactérias foram isoladas, através do semeio em superfície na placa de Petri, em meio de cultura de Luria-Bertani Agar (LB) (Atlas, 1995), após os processos de aclimação e enriquecimento. Os isolados foram preservados em meio de LB.

3.2.5. Quantificação de bactérias biodegradadoras de naftaleno

Uma suspensão de 10 μL dos micro-organismos isolados foi semeada de forma pontual em três repetições, em meio de cultura de BH ágar, com o acréscimo de 300 μL de uma solução a 2% (w/v) de naftaleno. Obteve-se uma fina camada branca de naftaleno com a finalidade de verificar a possível formação de um halo ao redor da colônia, no prazo de até 72 horas após a inoculação, o que indicaria a produção de enzimas capazes de degradar o naftaleno (Um et al., 2010).

Os micro-organismos isolados foram também avaliados quanto ao seu potencial de biodegradar o naftaleno. Utilizou-se o indicador redox 2,6 diclorofenol-indofenol

(DCPIP) descrito por Hanson et al. (1993), que permite acompanhar a oxidação microbiana de hidrocarbonetos pela mudança de coloração. Foram utilizadas placas multiposcos contendo 210 µL de meio mineral BH, 25 µL da suspensão microbiana padronizada, 5 µL de DCPIP e 10 µL do naftaleno na concentração de 1 mg/L, como fonte de carbono. Os experimentos foram realizados em três repetições e incubados a 30°C por 24 h para leitura dos resultados. Foi utilizada glicose como controle positivo e ausência de fonte de carbono, como controle negativo, sendo utilizadas as mesmas condições descritas para o ensaio.

3.2.6. Identificação da diversidade bacteriana utilizando 16S rDNA como biomarcador

As bactérias utilizadas neste estudo foram inicialmente identificadas por análise do polimorfismo dos fragmentos de genes 16S do rDNA, usando o conjunto de *primers* universal 27F e 1492R para bactéria (Tabela 1), com tamanho de bandas esperadas em 1465 pares de bases (DeLong, 1992).

A PCR foi realizada em um volume total de 25 µL, contendo 2 mmol de MgCl₂; 0,2 mmol de dNTP; 0,2 µmol de *primer* (Sigma); 1 U de GoTaq® polimerase (Promega, Madison, USA) e 250 ng de amostra de DNA. Os ciclos foram de desnaturação inicial a 95 °C por 30 segundos, seguidos por 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 56 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos. O ciclo foi completado por etapa de extensão final a 72 °C por 10 minutos. A presença dos produtos de amplificação foi evidenciada através de gel de agarose, onde alíquotas de 5 µL dos produtos amplificados foram separados em gel de agarose a 1% em Tris-Acetado EDTA (TAE) e visualizados por coloração com brometo de etídio. Os produtos da amplificação da PCR foram sequenciados e a identificação foi baseada em comparações de sequências usando a ferramenta BLAST do banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes por PCR.

Iniciadores	Gene Alvo	Sequência dos iniciadores (5'-3')*	Tamanho do produto (bp)	Referência
27F	16S rDNA	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	1465	DeLong (1992)
1492R		5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'		
PAH-RHD _α GPF	Naftaleno dioxigenase Gram positiva	5'-CGGCGCCGACAAATTYGTNGG-3'	292	Cébron et al. (2008)
PAH-RHD _α GPR		5'-GGGGAACACGGTGCCRTGDATRAA-3'		
PAH-RHD _α GNF	Naftaleno dioxigenase Gram negativa	5'-GAGATGCATACCACGTKGGTTGGA-3'	306	Cébron et al. (2008)
PAH-RHD _α GNR		5'-AGCTGTTGTTCGGGAAGAYWGTCM GTT-3'		
C120 F	Catecol 1,2-dioxigenase	5'-CGCGGATTGTNGAYSTNTGGCANG CNAAYAC-3'	324	Tuan et al. (2011)
C120 R		5'-GACTCAGGTNGCRWANGCRAARTC RTC-3'		
C230 F	Catecol 2,3-dioxigenase	5'-GCGCGGAATCGGNATGGAYTTYAT GGSNTT-3'	439	Tuan et al. (2011)
C230 R		5'-GATGAGGGTCAGSNACRTCRTGNG CYTTNGT-3'		

R= A/G, Y= C/T, K= G/T, S= C/G, W= A/T, D= A/G/T, N= A/C/G/T, pb= pares de base

3.2.7. Identificação de bactérias degradadoras de naftaleno utilizando a região *naftaleno dioxigenase (nahAc)* como biomarcador

A sub-unidade α do domínio catalítico que contém a proteína Fe₂-S₂, responsável pela degradação do naftaleno, é codificada pelo gene *nahAc* (Kauppi et al., 1998). O fragmento do gene *nahAc* foi amplificado usando o conjunto de *primers*, descritos por Cébron et al. (2008), PAH-RHD_α GPF e PAH-RHD_α GPR (Tabela 1) para bactérias Gram-positivas e o PAH-RHD_α GNF e PAH-RHD_α GNR (Tabela 1) para bactérias Gram-negativas, com tamanho de bandas esperadas em 292 e 306 pares de bases, respectivamente.

A PCR foi realizada em um volume total de 25 µL, contendo 1,5 mmol de MgCl₂; 0,2 mmol de dNTP; 0,2 µmol de *primer* (Sigma); 1,25 U de GoTaq[®] polimerase (Promega, Madison, USA) e 250 ng de amostra de DNA. Os ciclos foram de desnaturação inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguido por 50 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a (54 °C para PAH-RHD_α GP e 57 °C para PAH-RHD_α GN) por 30 segundos e extensão a 80 °C por 10 segundos. O ciclo foi completado por etapa de extensão final a 72 °C por 7 minutos. A presença dos possíveis produtos de amplificação foi determinada em gel de agarose com tamanho de bandas esperados em 292 pares de base para o PAH-RHD_α GP FR e 306 pares de base para o PAH-RHD_α GN FR. Alíquotas de 5 µL dos produtos amplificados foram separadas em gel de agarose 1% em Tris-Acetado EDTA (TAE) e visualizados por coloração com brometo de etídio.

3.2.8. Análise das vias de degradação de bactérias através dos genes catecol dioxigenase

O catecol é o principal intermediário da via de degradação do naftaleno, onde a partir dele, o micro-organismo pode seguir as vias de degradação meta ou orto, de acordo com seu potencial enzimático. Desta forma, foram utilizados os iniciadores descritos por Tuan et al. (2011) (Tabela 1), com a finalidade de descrever as possíveis rotas de degradação do naftaleno. Os ciclos foram de desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 15 ciclos e desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 60 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto. O ciclo foi completado por etapa de extensão final a 72 °C por 10 minutos. Alíquotas de 5 µL dos produtos amplificados foram separados em gel de agarose a 1% em Tris-Acetado EDTA (TAE) e visualizados por coloração com brometo de etídio.

3.2.9. Análise filogenética

Sequências parciais dos genes 16S rDNA foram comparadas com sequências de referência obtidas a partir do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) utilizando o BLAST – Programas de pesquisa de similaridade de alinhamento de nucleotídeos, a partir do banco de dados GenBank.

3.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Caracterização do solo

O tamanho dos grãos é um fator importante na diminuição da atenuação natural de hidrocarbonetos e pode influenciar a distribuição e concentração de HPAs, em caso de acidentes, devido aos processos de sorção e dessorção (Fontana et al., 2010).

A praia de Suape exibe uma textura arenosa, onde cerca de 100% corresponde a partículas de areia, segundo a classificação de Flemming (2000). A areia é classificada como de granulometria média a grossa, sendo a grossa (2000-600 μ m), dominante entre as frações, apresentando 89,22%, seguido por 9,21% de areia com granulometria média e menos de 2% com granulometria fina, corroborando com Teódulo et al. (2003) e Pereira et al. (2013), para ambientes costeiros de praia.

A composição de um sedimento reflete as características de sua fonte (Flemming, 2000). A porção sul da região do Cabo de Santo Agostinho, onde se localiza a praia de Suape, caracteriza-se por sedimentos da Formação Barreiras que constituem sedimentos de areia grossa e coloração variada (Teódulo et al., 2003). O diâmetro médio dos grânulos ($d_{50} \leq 1000 \mu\text{m}$) foi de 510 μm , sem a presença de frações finas como silte e argila, o que caracteriza uma situação hidrodinâmica elevada. Esse resultado se assemelha aos de Pereira et al. (2013) que obtiveram um resultado de 690 μm para o Atol das Rocas, no ocidente do Atlântico Sul, próximo à região Nordeste do Brasil.

Características abióticas são importantes para determinar a diversidade da população microbiana. Os valores de nitrogênio total, fósforo total, potássio, cálcio, magnésio, enxofre e matéria orgânica total foram de: 1,84; 0,27; 0,33; 1,12; 0,22; 0,12; 1,06 mg/kg, respectivamente.

A abundância de micro-organismos nas areias de praia pode estar relacionada à limitação de nutrientes (Khiyama e Makemsom, 1973). A baixa concentração de nitrogênio pode estar limitando o crescimento microbiano. Enquanto que a baixa disponibilidade de fósforo pode explicar a baixa abundância de bactérias heterotróficas presentes na amostra (Molina et al., 2009; Mariano et al., 2007).

Fontana et al. (2010), ao estudarem uma área de sedimento costeiro do manguezal do Suruí, Baía de Guanabara - RJ, encontraram quantidades inferiores a 1% de matéria orgânica o que se assemelham ao presente estudo. A presença de matéria

orgânica permite o sequestro de poluentes devido à sorção elevada, favorecendo uma ligação preferencial com hidrocarbonetos.

O pH do solo foi 7,38, estando próximo da neutralidade, o que pode ter selecionado uma biota microbiana neutrófila, uma vez que esta faixa de pH favorece a presença de bactérias neutrófilas (Jacques, et al., 2010; Zílio et al., 2012).

Para a situação da praia de Suape, que consiste em um sedimento 100% arenoso, com granulometria predominante grossa e escassa quantidade de matéria orgânica, sugere-se que possa haver uma menor sorção de hidrocarbonetos para o ambiente, em caso de acidentes. A adição de fertilizantes à base de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) representa uma boa estratégia de bioestímulo da população microbiana, podendo ser indicativa de utilizações futuras nas áreas impactadas por atividades petrolíferas que sejam pobres em nutrientes (Lima et al., 2012).

3.3.2. Enriquecimento das culturas para o isolamento e condições de crescimento

A avaliação de micro-organismos *in situ* é necessária para avaliar a ação hidrocarbonoclástica microbiana na natureza. A quantificação microbiana foi estimada em $9,2 \times 10^3$ unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de solo seco, quando não submetido a nenhum tratamento. Dados semelhantes foram descritos por Khiyama e Makemsom (1973), que encontraram concentrações na ordem de 10^4 para ambientes de praia. Os resultados indicam que uma grande proporção de bactérias ativas de ecossistema de praia podem não ser cultivável ou que as bactérias desempenham uma taxa de crescimento muito baixa (Heinänen, 1991).

Os micro-organismos isolados da praia são tolerantes ao naftaleno em concentrações de 30 mg/L, no entanto, não foi evidenciado o crescimento bacteriano nos frascos sem adição da fonte de carbono de fácil assimilação (glicose; glicerol; glicose e glicerol) como bioestímulo. Isto indica que esses micro-organismos parecem não serem capazes de utilizar o naftaleno como fonte de carbono ou não estarem aclimatados a esse tipo de composto. Segundo Miranda et al. (2007), a adaptação dos micro-organismos ao poluente é preponderante no processo de biodegradação. Um forte apoio para tal hipótese vem dos esforços de triagem para genes que codificam enzimas hidrocarbonoclásticas dentro dos genomas (Martins e Peixoto, 2012).

Segundo Van Hamme et AL. (2003), a caracterização de micro-organismos hidrocarbonoclásticos em ambientes naturais, fornece parâmetros para o processo de

bioestimulação e biorremediação *in situ*. Quando bioestimulados, a quantificação microbiana foi estimada em valores três vezes maiores, quando comparados à avaliação *in situ*, apresentando uma quantificação microbiana viável estimada em $1,8 \times 10^{10}$, $1,2 \times 10^{10}$ e $1,5 \times 10^{10}$ UFC, por grama de solo seco, para os estímulos de 0.1% de: glicose; glicerol; glicose e glicerol, respectivamente. No entanto, o catabolismo de hidrocarbonetos pode ser avaliado como uma capacidade generalizada se considerada apenas a quantificação da biomassa microbiana (Molina et al., 2009); principalmente se o seu crescimento estiver associado a um bioestímulo, sendo requeridas análises moleculares para a uma compreensão sobre suas potencialidades biodegradadoras.

Os micro-organismos, embora sejam capazes de degradar poluentes orgânicos xenobióticos, podem não degradá-los, porque tendem a utilizar outro composto orgânico em preferência ao poluente (Mariano et al., 2007), o que sugere que os micro-organismos isolados da praia tenham crescido utilizando a fonte de carbono bioestimuladora e que são tolerantes ao naftaleno. No entanto, parece não utilizarem o naftaleno como fonte de carbono para seu metabolismo, uma vez que quando em contato com o naftaleno, sem o bioestímulo, não foi evidenciado o crescimento bacteriano.

3.3.3. Quantificação de bactérias biodegradadoras de naftaleno

Os resultados não evidenciaram o crescimento bacteriano, e consequentemente a formação de halos de degradação do naftaleno após o prazo de até 72 horas de inoculação. Também não foi evidenciada a mudança de coloração do meio de cultura, proveniente da oxidação microbiana de hidrocarbonetos com até 72 horas.

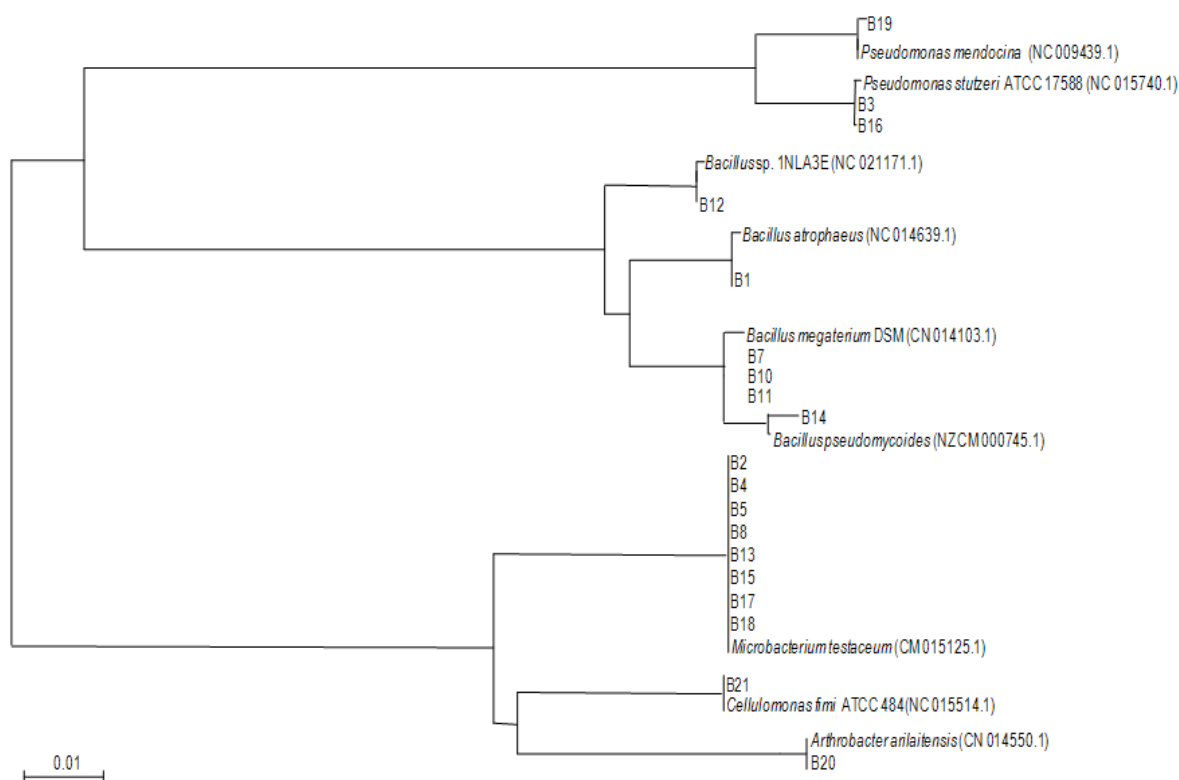
Miranda et al. (2007) encontraram resultados positivos para a biodegradação de óleo diesel em uma lagoa próxima à praia de Suape. Embora esses resultados sejam promissores para processos de biorremediação, parecem não ser realistas para aplicabilidade prática em ambientes costeiros de praia, uma vez que os micro-organismos encontrados são adaptados a ambientes continentais e não a ambientes marinhos.

Os resultados apresentados levantam o indicativo que os micro-organismos avaliados não apresentam potencial para biodegradação de naftaleno, o que deve ser confrontado com os dados moleculares.

3.3.4. Identificação da diversidade bacteriana utilizando 16S rDNA, naftaleno dioxigenase (nahAc), catecol 1,2-dioxigenase e catecol 2,3-dioxigenase como biomarcadores

As bactérias foram identificadas tendo como base um grau de confiabilidade superior a 96% de similaridade (Figura 7). Embora o rDNA proporcione uma visão da comunidade bacteriana existente, não se pode identificar se as bactérias são capazes de degradar o naftaleno (Lu et al., 2011).

Figura 7: Dendrograma com a análise do perfil da diversidade das bactérias isoladas da praia de Suape.



A região dos genes rDNA 16S é a mais informativa para uma análise filogenética preliminar (Nazina et al., 2002). Os resultados demonstram que a comunidade microbiana investigada está representada por cinco agrupamentos, entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Fig. 7).

O primeiro grupo de bactérias incluiu representantes do gênero *Pseudomonas*. As estirpes B3, B16 e B19 foram alocadas neste grupo por apresentarem sequências de

gene 16S rDNA que possuem 99% de similaridade para o referido gênero. Isso permitiu que estas três estirpes pudessem ser identificadas como *Pseudomonas stutzeri* (B3 e B16) e *Pseudomonas mendocina* (B19).

As estirpes B1, B12 e B14 foram as mais próximas dos táxons *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus* sp. e *Bacillus pseudomycoides*, respectivamente, com 97% de similaridade. Contudo, este nível de semelhança não é suficientemente alto para elas serem atribuídas a esses táxons. No entanto, a alta similaridade (99%) dos genes de rDNA 16S das estirpes B7, B10 e B11, sugerem que essas estirpes pertencem a espécie *Bacillus megaterium*.

Os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, encontrados neste estudo, têm sido associados à degradação de hidrocarbonetos de petróleo em diversos estudos (Nazina et al. 2002; Saadoun, 2002; Harayama et al., 2004). Harayama et al. (2004) descrevem tais gêneros como bactérias capazes de degradar o naftaleno, em ambientes marinhos e terrestres, contudo, é imaturo predizer o potencial microbiano sem investigar suas potencialidades.

O gênero *Microbacterium* foi o mais abundante, com similaridade de 99% para oito estirpes (B2, B4, B5, B8, B13, B15, B17 e B18), que são semelhantes a bactéria *Microbacterium testaceum* StLB039. Possivelmente, as condições do local de isolamento foram mais favoráveis para o referido táxon, o que refletiu em sua abundância.

A estirpe B20 apresentou 99% de similaridade com *Arthrobacter arilaitensis*; enquanto que a estirpe B21 foi apenas 96% similar à *Cellulomonas fimi* ATCC 484. Este nível de semelhança não é suficiente para uma relação com a espécie descrita. Presumivelmente, a bactéria B21 pode representar uma nova espécie do gênero *Cellulomonas*, e outros estudos devem ser realizados para confirmar essa hipótese.

Não houve a presença de amplificação dos sítios alvo, para nenhuma das bactérias isoladas frente aos iniciadores naftaleno dioxigenase (nahAc), catecol 1,2-dioxigenase e catecol 2,3-dioxigenase. Este fato sugere que as bactérias isoladas não apresentam capacidade de biodegradar o naftaleno e o catecol, seu principal intermediário. Esses resultados corroboram com os dados da avaliação de biodegradação do naftaleno para os micro-organismos testados. Desta forma, os micro-organismos avaliados não possuem potencial genético para degradação desse tipo de hidrocarboneto poliaromático e seu intermediário, não sendo possível auxiliar no processo de biorremediação em caso de acidentes no local.

De qualquer forma, a análise biológica molecular permitiu que as bactérias fossem classificadas em grupos. Os dados apresentados traçam uma idéia da diversidade dos micro-organismos aeróbios, no sedimento arenoso, da área costeira da praia de Suape, Brasil.

3.4. CONCLUSÕES

Os micro-organismos isolados da praia são tolerantes ao naftaleno em concentrações de até 30 mg/L, no entanto, não apresentam capacidade genética para biodegradá-lo, assim como ao catecol, seu principal intermediário de degradação. Entre as bactérias encontradas na areia da praia de Suape, incluem os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Cellulomonas* e *Arthrobacter*, sendo o gênero *Microbacterium* o mais abundante.

3.5. REFERÊNCIAS

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Norma Técnica NBR 6502. Rochas e solos. Rio de Janeiro, 1995.

Atlas, R. M. Handbook of Media Environmental Microbiology, CRC Press, London. 1995.

Araruma, J. T.; Portes, V. L. O.; Soares, A. P. L.; Silva, M. G.; Sthel, M. S.; Schramm, D. U.; Tibana, S.; Vargas, L. Oil spills debris clean up by thermal desorption. Journal of Hazardous Materials. v. 110, p.161-171, 2004.

Cammarota, M. C.; Freire, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. Bioresource Technology. v. 97, p. 2195-2210, 2006.

Cébron, A.; Norini, M. P.; Beguiristain, T.; Leyval, C. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD_o) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. Journal of Microbiological Methods. v. 73 (2), p. 148-159, 2008.

Celino, J. J.; Oliveira, O. M. C.; Hadlich, G. M.; Queiroz, A. F. S.; Garcia, K. S. Assessment of contamination by trace metals and petroleum hydrocarbons in sediments from the tropical estuary of Todos os Santos Bay, Brazil. *Revista Brasileira de Geociências*. v. 38 (4), p. 753-760. 2008.

Celino, J. J.; Queiroz, A. F. S. Fonte e grau da contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de baixa massa molecular em sedimentos da baía de Todos os Santos, Bahia. *Revista Escola de Minas, Ouro Preto*. v. 59 (3), p. 265-270, 2006.

Del'Arco, J. P.; França, F. P. Biodregeneration of crude oil in sandy sediment. *International Biodeterioration and Biodegradation*. v. 44, p. 87-92, 1999.

Del'Arco, J. P.; França, F. P. Influence of oil contamination levels on hydrocarbon biodregeneration in sandy sediment. *Environmental Pollution*. v. 110, p. 515-519, 2001.

DeLong, E. F. Archae in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 89, p. 5685-5689, 1992.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Manual de métodos de análise de solo. 2.ed. Rio de Janeiro, Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 212p., 1997.

Fang, J.; Barcelona, M. J. Coupled oxidation of aromatic hydrocarbons by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Chemosphere*. v. 50, p. 105-109, 2003.

Flemming, B. W. A revised textural classification of gravel-free muddy sediments on the basis of ternary diagrams. *Continental Shelf Research*. v.20, p. 1125-1137, 2000.

Fontana, L. F.; Silva, F. S.; Figueiredo, N. G.; Brum, D. M.; Perreira-Netto, D. P.; Figueiredo-Junior, A. G.; Crapez, M. A. C. Superficial distribution of aromatic compounds and geomicrobiology of sediments from Suruí mangrove, Guanabara Bay, RJ, Brazil. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. v. 82 (4), p. 1013-1030, 2010.

Hanson, K. G.; Desai, J. D.; Desai, A. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology Techniques*. v. 10, p. 745-748, 1993.

Harayama, S.; Kasai, Y.; Hara, A. Microbial communities in oil-contaminated seawater, *Current Opinion in Biotechnology*. v. 15, n. 3, p. 205–214, 2004.

Heinänen, A. P. Bacterial numbers, biomass and productivity in the Baltic Sea: a cruise study. *Marine Ecology Progress Series*. v. 70, p. 283-290, 1991.

Jacques, R. J. S.; Silva, K. J.; Bento, F. M.; Camargo, F. A. O. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. *Ciência Rural*, Santa Maria. v. 40 (2), p. 310-317, 2010.

Khiyama, H. M.; Makemsom, J.C. Sand beach bacteria: Enumeration and characterization. *Applied Microbiology*. v. 26 (3), p. 293-297, 1973.

Kauppi, B.; Lee, K.; Carredano, E.; Parales, R. E.; Gibson, D. T.; Eklund, H.; Ramaswamy, S. Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase – naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure*. v. 6 (5), p.571-586, 1998.

Koenig, M. L.; Eskinazi-Leça, E.; Neumann- Leitão, S.; Macêdo, S. J. Impactos da construção do porto de Suape sobre a comunidade fitoplanctônica no estuário do rio Ipojuca (Pernambuco-Brasil). *Acta Botânica Brasilica*. v. 16 (4), p. 407-420, 2002.

Lima, D. F.; Oliveira, O. M. C.; Cruz, M. J. M.; Triguís, J. A.; Queiroz, A. F. S. Bioremediation in Mangrove Sediments Impacted by Oil Using Two Types of Fertilizers NPK and OSMOCOTE, Brazil. *Open Journal of Marine Science*. v. 2, p.119-130, 2012.

Lu, X.; Zang, T.; Fang H. H. P.; Leung, K. M. Y.; Zhang, G. Biodegradation of naphthalene by enriched marine denitrifying bacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*. v. 65, p. 204-211, 2011.

Mariano, A. D.; Kataoka, A. P. A. G.; Angelis, D. F.; Bonotto, D. M. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 38, p. 346-353, 2007.

Martins, L. F.; Peixoto, R. S. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 43 (3), p. 865-872, 2012.

Miranda, R. C.; Souza, C. S.; Gomes, E. B.; Lovaglio, R. B.; Lopes, C. E.; Sousa, M. F. V. Q. Biodegradation of diesel oil by yeasts isolated from the vicinity of Suape Port in the state of Pernambuco-Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 50 (1), p.147-152, 2007.

Molina, M. C.; González, N.; Bautista, L. F.; Sanz, R.; Simarro, R.; Sánchez, I.; Sanz, J. L. Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. *Biodegradation*. v. 20, p. 789–800, 2009.

Moreira, I. T. A.; Oliveira, O. M. C.; Triguís, J. A.; Queiroz, A. F. S.; Ferreira, S. L. C.; Martins, C. M. S.; Silva, A. C. M.; FALCÃO, B. A. Phytoremediation in mangrove sediments impacted by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH s) using *Avicennia schaueriana*. *Marine Pollution Bulletin*. v. 67, p. 130-136, 2013.

Moreira, I. T. A.; Oliveira, O. M. C.; Triguís, J. A.; Santos, A. M. P.; Queiroz, A. F. S.; Martins, C. M. S. ; Silva, C. S.; Jesus, R. S. Phytoremediation using *Rizophora mangle* L. in mangrove sediments contaminated by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH's). *Microchemical Journal*. v. 99, p. 376-382, 2011.

Nazina, T. N.; Grigor'yan, A. A.; Xue, Y.; Sokolova, D. S.; Novikova, E. V.; Yourova, T. P.; Poltarau, A. B.; Balyaev, S. S.; Ivanov, M. V. Phylogenetic diversity of aerobic saprotrophic bacteria isolated from the daqing oil field. *Microbiology*. v. 71, n.1, p.91-97, 2002.

Peel, M. C.; Finlayson, B. L.; McMahon, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences*. v. 11, p. 1633-1644, 2007.

Pereira, N. S.; Manso, V. A. V.; Macedo, R. J. A.; Dias, J. M. A.; Silva, A. M. C. Detrital carbonate sedimentation of the Rocas Atoll, South Atlantic. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. v. 85 (1), p. 57-72, 2013.

Poffo, I. R. F. Vazamentos de óleo no litoral norte do estado de São Paulo. Análise histórica (1974- 1999). Dissertação de Mestrado. PROCAM/USP – Programa de Pós-graduação em Ciência Ambiental da Universidade de São Paulo, 2000. Acesso em 24/06/2013. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/publicacoes/11.pdf>

Saadoun, I. Isolation and characterization of bacteria from crude petroleum oil contaminated soil and their potential to degrade diesel fuel. *Journal of Basic Microbiology*.v. 42 (6), p.420–428, 2002.

Santa Anna, L. M.; Soriano, A. U.; Gomes, A. C.; Menezes, E. P.; Gutarra, M. L. E.; Freire, D. M. G.; Pereira Jr, N. Use of biosurfactant in the removal of oil from contaminated sandy soil. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. v. 82, p. 687-691, 2007.

Silva, A. P.; Neumann-Leitão, S.; Schwamborn, R.; Gusmão, L. M. O.; Silva, T. A. Mesozooplankton of an impacted bay in north eastern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and technology*. v. 47 (3), p. 485-493, 2004.

Teódulo, M. J. R.; Lima, E. S.; Neumann, V. H. M. L.; Leite, P. R. B.; Florêncio, L. Comparação de métodos de extração parcial de metais traço em solos e sedimentos de um estuário tropical sob a influência de um complexo industrial portuário, Pernambuco Brasil. *Estudos Geológicos*. v. 13, p. 23-34, 2003.

Tuan, N. N.; Hsieh, H. C.; Lin, Y. W.; Huang, S. L. Analysis of bacterial degradation pathways for long-chain alkylphenols involving phenol hydroxylase, alkylphenol monooxygenase and catechol dioxygenase genes. v. 102, p. 4232-4240, 2011.

Um Y.; Chang, M. W.; Holoman, T. P. A simple and effective plating method to screen polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria under various redox conditions. *Applied Microbiology Biotechnology*. v. 88, p. 291-297, 2010.

Van Hamme, J. D.; Singh, A; Ward, O P. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v.9, p.503-549, 2003.

Ya-Hui, C.; Cheng-Hua, L.; Yu-Min, T.; Jo-Shu, C.; Po-Neng, C.; Ming-Kuang, W. Comparison and characterization of chemical surfactants and bio-surfactants intercalated with layered double hydroxides (LDHs) for removing naphthalene from contaminated aqueous solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v. 366, p.170-177, 2010.

Wauchope, R. D.; Savage, K. E.; Koskinen, W. C. Adsorption-desorption equilibria of herbicides in soil: A thermodynamic perspective. *Weed Science*. v. 31, p. 744-751, 1983.

Zílio, R. L.; Holz, J. C. P.; Goularte, P. G.; Radmann, E. M.; Treichel, H.; Costa, J. A. V. Bioremediation of a sand soil contaminated by simulated spill of benzene, toluene and xylene. *Biochemistry and Biotechnology Reports*. v. 1 (2), p. 39-47. 2012.

01	Introdução, objetivo e esboço da tese
02	Revisão Bibliográfica
03	Diversidade de bactérias de ambiente costeiro tropical e suas potencialidades em biodegradar o naftaleno
04	Produção simultânea de ramnolipídeo e polihidroxicanoatos por estirpes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de poços de petróleo
05	Considerações Finais

0.5 μ m

Manuscrito 2:

**Produção simultânea de ramnolipídeo e
polihidroxicanoatos por estirpes de *Pseudomonas
aeruginosa* isoladas de poços de petróleo**

Produção simultânea de ramnolipídeo e polihidroxialcanoatos por estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de poços de petróleo

RESUMO

Resíduos agroindustriais são considerados substratos promissores para a produção de compostos de interesse industrial, como os ramnolipídeos (RL) e polihidroxialcanoatos (PHA). Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a produção simultânea do RL e PHA, produzidos a partir do glicerol, resíduo da fábrica do biodiesel, utilizando estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*, isoladas de poços de petróleo. Durante os ensaios de produção do RL, foi realizada sua purificação e caracterização por LCMS-IT-TOF; concentração da biomassa; a determinação do pH e do índice de emulsificação. A caracterização do PHA foi realizada através do microscópio eletrônico de transmissão e foram efetuados ensaios de ecotoxicidade. Os resultados evidenciam que a produção do RL está associada ao crescimento celular. Embora o glicerol, tenha se mostrado promissor para a produção de RL, as bactérias estudadas apresentaram uma baixa produção de RL quando utilizaram esse tipo de glicerol como substrato. A estirpe UFPEDA-563 apresentou a maior produção de RL com valores máximos de 3,27 g/ L em um período de 120 horas. Somente esta estirpe apresentou um índice de emulsificação superior a 90%. O caldo livre de células, o controle negativo, apresentou toxicidade aguda para juvenis de *Daphia magna* em todas as amostras analisadas. O homólogo mono-ramno-di-lipídeo (Rha-C₁₀-C₁₂ ou Rha-C₁₂-C₁₀) foi o RL predominante nas amostras investigadas. Altos níveis de acumulação de PHA foram observados na forma de grânulos. Essa abordagem pode ser transformada em vantagem devido à produção concomitante de ambos os metabolitos (RL e PHA).

Palavras-chave: Biosurfactante; ecotoxicidade; glicerol; emulsificação; glicolipídeo.

ABSTRACT

Agroindustrial residues are considered promising substrate for the production of compounds of industrial interest such as rhamnolipids (RL) and polyhydroxyalkanoate (PHA). This study aimed to evaluate the simultaneous production of RL and PHA produced from glycerol residue of the biodiesel plant, using strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from oil wells. During the tests of production of RL were performed its purification and characterization by LCMS-IT-TOF, biomass concentration, the determination of pH, the rate of emulsification. The characterization of the PHA was performed using transmission electron microscopy and ecotoxicity tests were performed. The results show that the production of RL is linked to cell growth. Although glycerol, has shown promise for producing RL, bacteria studied showed a low production of free radicals such as glycerol used as the substrate. Strain UFPEDA-563 had the highest production of RL with maximum values of 3.27 g / L in a period of 120 hours. This strain had only one emulsifying index higher than 90%. The cell free broth, negative control, showed acute toxicity to juvenile *Daphia magna* in all samples. The homologous mono-di-rhamnolipid (Rha-C₁₀-C₁₂ or Rha-C₁₂-C₁₀) was predominant in the NR samples. High levels of accumulation of PHA were observed in the form of granules. This approach can be transformed to advantage due to the concomitant production of both metabolites (RL and PHA).

Keywords: Biosurfactant; ecotoxicity; glycerol; emulsification; glycolipid.

4.1. INTRODUÇÃO

Ramnolipídeos (RL) e polihidroxialcanoatos (PHA) produzidos por espécies de *Pseudomonas* apresentam uma ampla potencialidade de aplicações industriais e ambientais (Nitschke et al., 2011).

Os RL apresentam porções hidrofílicas e hidrofóbicas, constituídas por uma ou duas moléculas de raminose ligada a uma ou duas moléculas de β -hidrozidecanóico, sendo produzidos principalmente por bactérias do gênero *Pseudomonas* (Desai e Banat, 1997). Entre os ramnolipídeos, destacam-se os produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, que apresentam propriedades como capacidade emulsionante e solubilização de compostos hidrofóbicos, sendo sua aplicação relacionada à utilização industrial e ambiental (Desai e Banat, 1997; Singh et al., 2007).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* podem acumular Polihidroxialcanoatos (PHA) na forma de grânulos intracelulares. Polihidroxialcanoatos são polímeros que podem ser acumulados por algumas bactérias em grande quantidade sem afetar a pressão osmótica das células. Estes polímeros podem representar até 80% da massa celular bacteriana. A função mais frequentemente atribuída a estes grânulos é a de reserva de carbono, energia e propriedades flexíveis (Anderson e Dawes, 1990; Nitschke, et al., 2011).

A principal vantagem de RL e PHA são suas propriedades biodegradáveis e potencialidades de substituição de detergentes químicos e plásticos. No entanto, uma desvantagem para a sua utilização é atribuída ao custo de produção e informações fidedignas sobre sua toxicidade (Nitschke, et al., 2011).

Diversos estudos foram realizados utilizando o glicerol como fonte de carbono para a produção de ramnolipídeos (Vidal-Max et al., 2001; Maneerat, 2005; Monteiro et al., 2007; Bharali e Konwar 2011 e Pantazaki et al., 2011). No entanto, poucos são os relatos envolvendo o glicerol como resíduo agroindustrial do sistema de produção de biodiesel (Rooney et al., 2009).

Embora o glicerol, subproduto da indústria do biodiesel, seja considerado um substrato promissor para a produção de biossurfactantes, devido à sua ampla disponibilidade e baixo custo, são escassos os trabalhos que destinaram esforços a esse tipo de investigação. Possivelmente, isso seja devido à alta concentração de sais, com valores próximos a 10% (w/v) (Berenchtein, et al. 2010).

O principal fator limitante na comercialização de biossurfactantes está associado à inviabilidade econômica na produção em larga escala. Para superar esse obstáculo e competir com surfactantes sintéticos, substratos de baixo custo e micro-organismos eficazes na produção de biossurfactantes precisam ser investigados a partir de resíduos agroindustriais (Maneerat, 2005).

Considerando o elevado custo de produção dos biossurfactantes, o isolamento de micro-organismos que apresentam potencial para esta produção e a utilização de substratos de baixo custo podem se apresentar como estratégias viáveis para a obtenção desses compostos (Accorsini et al., 2012). Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar a produção simultânea do biossurfactante ramnolipídeo, secretado extracelularmente, e polihidroxialcanoato, acumulado intracelularmente, produzidos a partir do glicerol, resíduo da fábrica de biodiesel, utilizando estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de poços de petróleo. Essa abordagem pode ser transformada em vantagem devido à produção concomitante de ambos os metabólitos (RL e PHA), que detêm um alto valor comercial, sendo produzidos a partir de um poluente hidrofílico sem valor agregado.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Micro-organismos

Foram utilizadas seis estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA-559; UFPEDA-563; UFPEDA-564; UFPEDA-571; UFPEDA-572; UFPEDA-614), originalmente isoladas de poços de petróleo, do Canto do Amaro (RN), e pertencentes à coleção de culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os micro-organismos foram preservados no meio de cultura de Agar Triptona de Soja (TSA), com a seguinte composição: Trypticase (15 g); peptona de soja (5 g); NaCl (5 g); Agar (15 g); água destilada (1 L) e ajuste para pH 7,2.

Uma suspensão microbiana a 5% foi utilizada como inóculo e foi preparada utilizando uma solução salina 0,9% (v/w). Células dos micro-organismos foram ressuspensas até atingir uma concentração entre 0,08 e 0,1 de absorbância a uma densidade óptica de 625 nm, equivalente a aproximadamente 10^8 células/mL.

4.2.2. Produção do biossurfactante ramnolipídeo

Para a produção de ramnolipídeo, as estirpes foram submetidas ao meio de sais descrito por Santa Anna et al. (2001), com a seguinte composição química: KH_2PO_4 (3 g); K_2HPO_4 (7 g); $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,2 g); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g); água destilada (1 L) e ajuste para pH 7,2; acrescentou-se 40 g de glicerol proveniente da refinaria do biodiesel (equivalente a 4%/ L), como fonte de carbono. Frascos de borosilicato, com capacidade para 500mL, foram acoplados a uma mesa agitadora na velocidade de 200 g, à temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por até 144 horas.

Durante o processo de produção de ramnolipídeo foram analisados os parâmetros: crescimento microbiano por contagem de células viáveis em placas de Petri utilizando o meio de cultura de TSA; pH, por potenciometria; concentração do ramnolipídeo, pela reação de fenol-ácido sulfúrico.

4.2.3. Determinação da concentração do biossurfactante

A quantificação do ramnolipídeo foi determinada de forma indireta expressa em raminose, através da metodologia descrita por Dubois et al. (1956). Foi utilizado 1 mL do caldo fermentado diluído na proporção de 1:10; 2 mL dessa diluição foram adicionados a 50 μL de fenol e 5 mL de ácido sulfúrico, seguido da leitura em espectrofotômetro a 480 nm. A concentração foi determinada utilizando a curva padrão de 0,005 a 0,1 g/L de raminose.

4.2.4. Extração e purificação do biossurfactante

Para obtenção do biossurfactante purificado, utilizou-se a método de precipitação ácida segundo Lotfabad et al. (2010). Ao final do tempo determinado para a produção do biossurfactante, as células foram removidas por centrifugação a 10000 g durante 20 minutos a 4°C . O sobrenadante livre de células foi acidificado pela adição de ácido clorídrico 6 N até atingir o pH 2, e em seguida foi incubado a 4°C durante 12 h. O precipitado resultante foi recolhido por centrifugação durante 20 minutos; e suspenso em clorofórmio-etanol (2:1 v/v), agitado vigorosamente e centrifugado para acelerar a separação das fases. A fase orgânica foi evaporada em rotaevaporador a 70°C .

4.2.5. Caracterização do biossurfactante por LCMS-IT-TOF

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando o método descrito por Lotfabad et al. (2010) em um espectrômetro de massa quadrupolo, do tipo LCMS-IT-TOF. O extrato seco do biossurfactante foi suspenso em uma mistura de água:acetonitrila (40:60 v/v), utilizando 2 mM de acetato de amônio. Foi utilizada uma coluna C18 de fase reversa com um gradiente inicial de 40% de acetonitrila por 4 minutos, seguido de 90% de acetonitrila por 25 minutos e 40% de acetonitrila por 30 minutos. A taxa de fluxo da fase móvel foi de 2,5 mL/minuto, diretamente introduzida no espectrômetro de massa. A temperatura do forno foi mantida entre 38 e 40°C. O intervalo de digitalização de varredura de massas foi de 150 a 800Da nos modos positivo e negativo. A fonte de ionização foi ESI (Electrospray). A quantificação foi determinada através da integração do peso molecular de cada composto.

4.2.6. Índice de emulsificação

A atividade emulsificante foi determinada, durante o processo de produção de ramnolípídeo, de acordo com o método descrito por Cooper e Goldenberg (1987). Inicialmente, 6 mL do mosto fermentado, livre de células, foram transferidos para tubos de ensaio, onde foram acrescidos de 4 mL de óleo diesel. Em seguida os tubos foram agitados vigorosamente em vortex durante 2 minutos, seguido de repouso por 24 horas, e logo após foi medido a camada emulsificada e a altura total da coluna líquida.

O tempo zero foi utilizado como testemunha a fim de se comparar os resultados obtidos, uma vez que o próprio meio podia mostrar atividade tensoativa; ou devido ao processo de obtenção e purificação do biodiesel, o glicerol podia conter pequenas quantidades de compostos com ação surfactante.

O índice de emulsificação (IE) corresponde à altura da camada emulsionada dividida pela altura total do líquido, multiplicada por 100, conforme a equação abaixo descrita por Cooper e Goldenberg (1987).

$$IE = (\text{altura da camada emulsificada} / \text{altura total}) \times 100$$

4.2.7. Caracterização de polihidroalcanoatos em microscopia eletrônica de transmissão

As amostras de biomassa bacteriana, dos tempos de 144hs de produção do ramnolipídeo, foram fixadas durante doze horas a 4° C com glutaraldeído a 2,5% em tampão cocodilato 0,1 M. Após a fixação, as amostras foram lavadas duas vezes no tampão cocodilato 0,1 M e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2% com cloreto de cálcio 5 mM e ferricianeto de potássio 0.8%, para uma maior contrastação do material; seguiram-se duas lavagens com tampão cocodilato 0,1 M e uma lavagem com água deionizada. Logo após, as amostras foram contrastadas em bloco com acetato de uranila a 5% durante 1 hora; e seguido de três lavagens de água destilada durante dez minutos para cada lavagem. Em seguida, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de acetona a 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, durante quinze minutos por lavagem.

Após o processo de fixação e lavagem, o material foi acondicionado *overnight*, gradativamente, em resina Epoxi, acetona:resina 2:1; 1:1; 1:2 e resina pura. As amostras foram emblocadas com resina e os blocos polimerizados em estufa a 60° C durante três dias. Foram realizados cortes ultrafinos, contrastados com uranila 5%, durante 25 minutos e com chumbo durante 5 minutos. As seções ultrafinas foram examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão, marca FEI Morgani 268D, pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

4.2.8. Ensaio de ecotoxicidade utilizando o micro crustáceo *Daphnia magna* como bioindicador ambiental

A toxicidade aguda, para o micro crustáceo *Daphnia magna*, foi avaliada pela exposição de juvenis de *Daphnia magna* a diferentes diluições da amostra por um período de 48 horas de acordo com a norma da ABNT NBR 12713. Os ensaios foram realizados na Agência Estadual de Meio Ambiente da Companhia Pernambucana de Recursos Hídricos (CPRH).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Determinação da produção e concentração do biossurfactante ramnolipídeo

Biossurfactantes do tipo ramnolipídeo são um grupo bem estudado da família dos glicolipídeos, sendo principalmente sintetizados por diferentes cepas de *P. aeruginosa* (Lotfabad et al., 2010). As seis linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* estudadas (UFPEDA- 559; UFPEDA-563; UFPEDA- 564; UFPEDA- 571; UFPEDA-572; UFPEDA-614), foram caracterizadas como produtoras de ramnolipídeo, em meio líquido, utilizando o glicerol como fonte de carbono. Os dados da produção do ramnolipídeo a partir das diferentes estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*, são ilustrados na Figura 8.

A produção do ramnolipídeo está associada ao crescimento celular e nos experimentos foi observado que a maior concentração, de 3,2g/L, de ramnolipídeo foi produzida com o tempo de 120 horas para todas as linhagens. A exceção foi à estirpe UFPEDA-572, que apresentou a maior produção com o tempo de 96 horas (Figura 8).

Os resultados evidenciam que o meio de cultura contendo glicerol apresenta uma baixa concentração de ramnolipídeos para todas as estirpes investigadas, exceto para a estirpe UFPEDA-563, que apresentou uma produção superior a 3g/L (Figura 8).

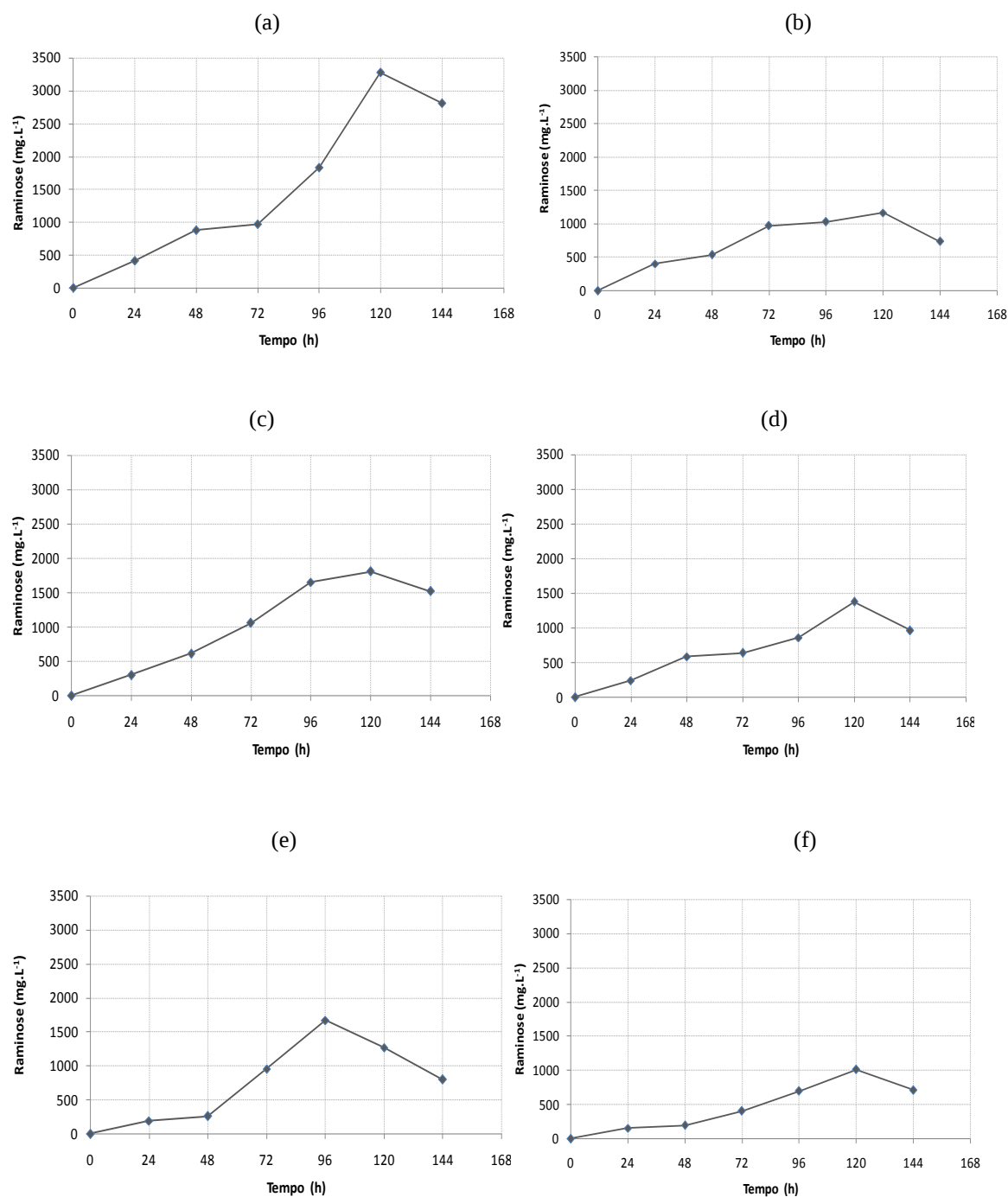
Resíduos agroindustriais são considerados substratos promissores para a produção de biotenssoativos. No entanto, a produção de ramnolipídeos por bactérias do gênero *Pseudomonas*, utilizando o glicerol, resíduo da fábrica de biodiesel, apresenta baixos rendimentos (Maneerat, 2005; Pantazaki et al., 2011).

Apesar da produção dos ramnolipídeos ser considerada baixa para quase todas as estirpes, os resultados encontrados são semelhantes aos valores de 3,5 e 3,9 g/ L, relatados por Vidal-Max et al. (2001) e Monteiro et al. (2007), respectivamente. Os resultados, que variaram entre 1 e 3,2 g/L, possivelmente, foram devidos às impurezas do glicerol, já que se trata de um rejeito da fábrica de biodiesel. Pode ter ocorrido ou sido requerido a solubilização de algum micro elemento para que houvesse uma maior disponibilidade à célula bacteriana; ou mais provavelmente, devido à capacidade genética de produção do ramnolipídeo atribuída às linhagens estudadas.

Segundo Bharali e Konwar (2011), a baixa produção do surfactante é devido à elevada solubilidade do glicerol, o que o torna disponível para as células bacterianas,

não havendo a necessidade do gasto energético para que as células produzam um biosurfactante a fim de melhorar a solubilidade ou disponibilidade da fonte de carbono.

Figura 8: Produção de ramnolípídeo expresso em raminose ao longo do tempo. (a) UFPEDA-563; (b) UFPEDA-564; (c) UFPEDA-571; (d) UFPEDA-559; (e) UFPEDA-572 e (f) UFPEDA-614



O gênero *Pseudomonas* é conhecido por sua ampla versatilidade nutricional que lhe permite utilizar muitos resíduos e poluentes como fonte de carbono e energia (Vasileva-Tonkava et al., 2011). No entanto, segundo Nitschke et al. (2005a), fontes de carbono hidrofílicas, como glicerol, apresentam menor rendimento na produção de biossurfactantes quando comparados com fontes hidrofóbicas.

Santa Anna et al. (2002) descrevem que há um efeito inibidor sobre o crescimento microbiano e a produção de biossurfactantes quando a concentração de glicerol excede 3%. Este efeito inibitório pode estar relacionado com a solubilidade do glicerol, o que dificulta o acesso da bactéria aos nutrientes no meio de cultura. Para o presente estudo, a alta concentração de glicerol parece não ter interferido na produção do ramnolipídeo, considerando que o glicerol avaliado é rico em impurezas, por ser um rejeito industrial.

A biomassa celular aumentou ao longo do processo para todos os diferentes isolados, alcançando valores máximos que variaram entre 2×10^7 e $3,2 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC/ mL) (Figura 9). Para todos os isolados a maior concentração de biomassa foi no tempo de 120 horas, exceto para a linhagem UFPEDA-572, que apresentou uma maior biomassa no tempo de 96 horas. Segundo Amaral et al. (2006), algumas espécies podem atingir a máximo da produção de biossurfactantes durante o seu crescimento na fase exponencial, o que corrobora com dados encontrados neste estudo (Figura 8), sugerindo a acumulação de ramnolipídeos como metabólitos secundários (Costa et al., 2006).

Tendo um valor inicial de pH 7,2, os valores finais do pH variaram entre 6,5 e 6,8 em até 144 horas (Figura 10). A alteração do pH é atribuída à produção de ácidos orgânicos produzidos pelo metabolismo da cultura. Costa et al. (2006) observaram resultados semelhantes com condições ácidas após 120 horas de cultivo, quando utilizaram óleo de maracujá como fonte de carbono.

A produção de ramnolipídeos demonstrou ser viável apenas para a estirpe UFPEDA-563. Estudos que potencializam o processo de produção de biossurfactantes são de grande importância, uma vez que a concentração desses compostos pode influenciar a velocidade de biodegradação de componentes hidrofóbicos, por estarem relacionados com a disponibilidade do composto à ação microbiana (Accorsini et al., 2012).

Figura 9: Biomassa expressa em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/ mL) ao longo do tempo. (a) UFPEDA-563; (b) UFPEDA-564; (c) UFPEDA-571; (d) UFPEDA-559; (e) UFPEDA-572 e (f) UFPEDA-614

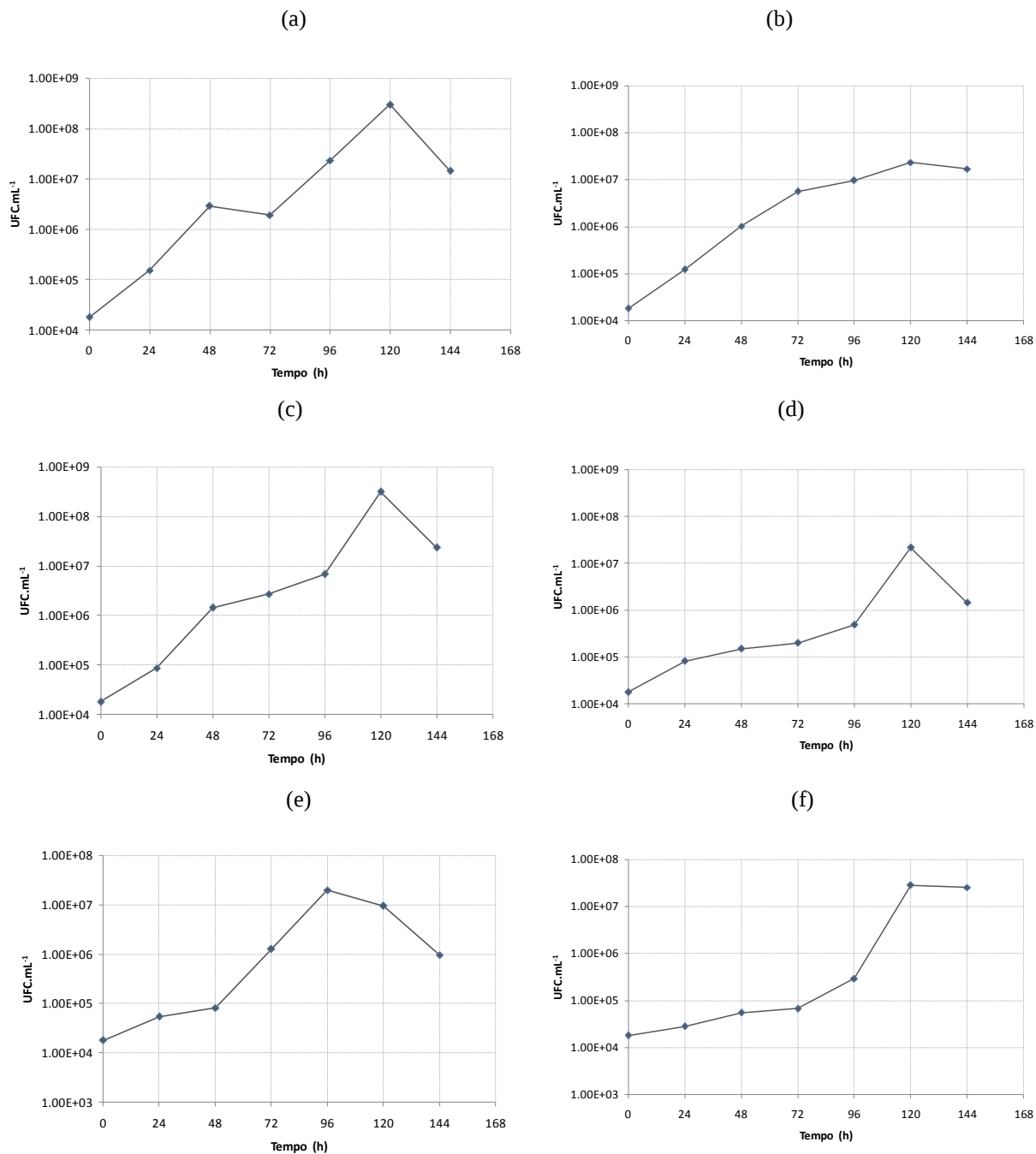
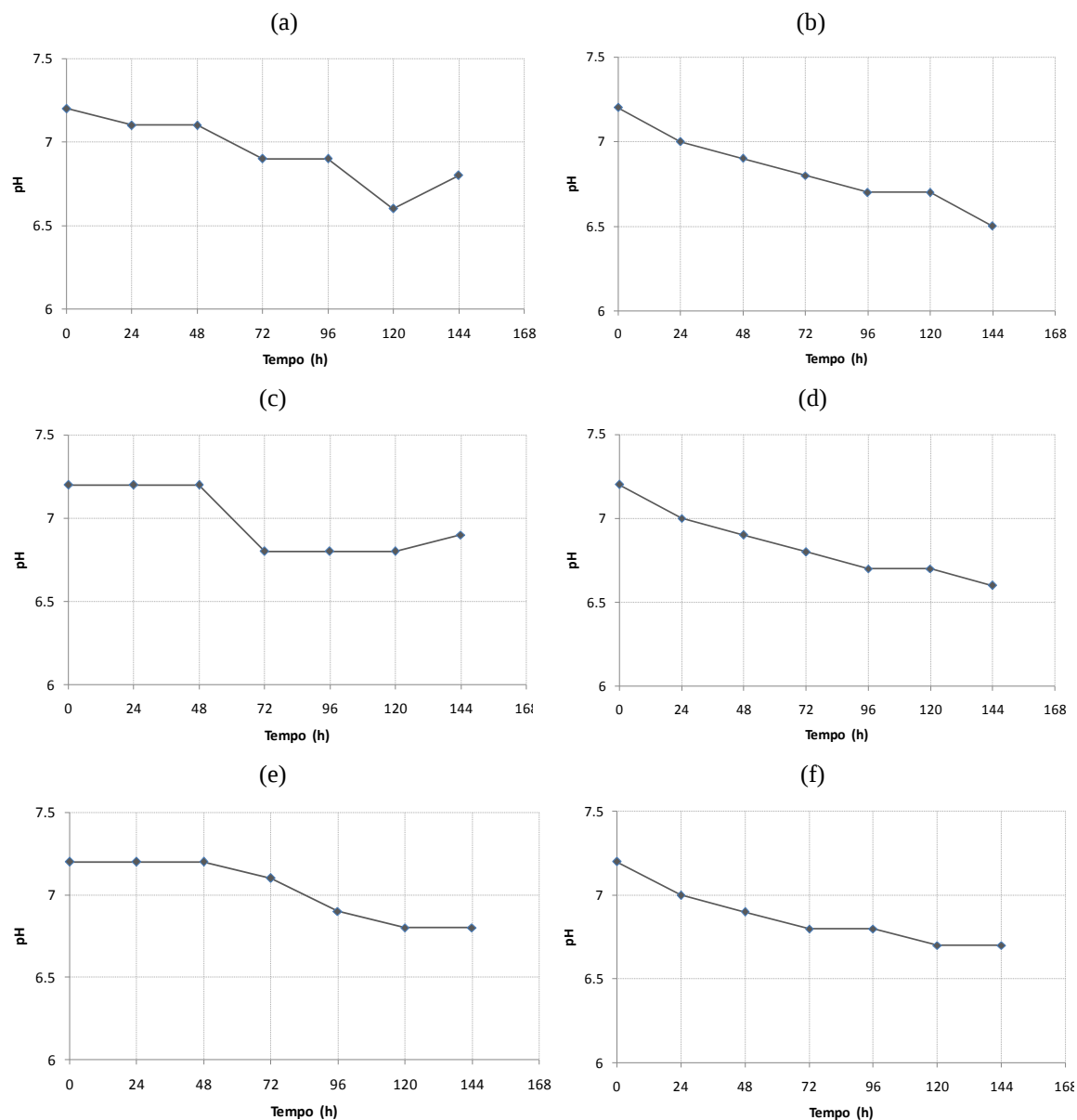


Figura 10: Variação dos valores de pH ao longo do tempo. (a) UFPEDA- 563; (b) UFPEDA-564; (c) UFPEDA- 571; (d) UFPEDA- 559; (e) UFPEDA- 572 e (f) UFPEDA-614



4.3.2. Índice de emulsificação

A capacidade de emulsificação é um fator importante para a caracterização de biossurfactantes. Uma medida prática para avaliar a produção de biossurfactante é a sua capacidade de emulsificar líquidos imiscíveis, formando emulsões estáveis após 24 horas. Os caldos das culturas contendo o ramnolipídeo foram capazes de formar emulsões estáveis (Tabela 2), sugerindo um potencial para minimizar ou eliminar a poluição ambiental.

A estirpe UFPEDA-563 apresentou um índice de emulsificação de até 93,3% para o mosto fermentado livre de células (Tabela 2), confirmando o resultado obtido na concentração de raminose e sugerindo que a linhagem UFPEDA-563 apresenta um potencial promissor para auxiliar em processos de biorremediação. Prieto et al. (2008); Pirôllo et al. (2008) e Bharali e Konwar (2011), também observaram a emulsificação do óleo diesel quando submetidos a uma mistura de ramnolipídeos, contribuindo para a disponibilidade dos hidrocarbonetos.

A amostra controle sem micro-organismo não foi emulsionado, evidenciando que o meio de cultura, livre de células, não apresenta atividade tensoativa.

Para as linhagens UFPEDA-559; DAUFPE-564 e UFPEDA-614, o índice de emulsificação foi inferior a 50 %, enquanto que para as linhagens UFPEDA-571 e UFPEDA-572 os resultados da emulsificação foram inferiores a 65%, evidenciando a incapacidade do biossurfactante produzido em estabilizar o óleo diesel (Tabela 2).

Tabela 2: Valores dos índices de emulsificação (%).

Tempo de fermentação (h)	UFPEDA-559	UFPEDA-563	UFPEDA-564	UFPEDA-571	UFPEDA-572	UFPEDA-614
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	0,0	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3
48	3,3	13,3	3,3	13,3	13,3	3,3
72	3,3	13,3	13,3	13,3	20,0	3,3
96	13,3	66,6	13,3	66,6	66,6	13,3
120	20,0	93,3	20,0	66,6	66,6	20,0
144	20,0	93,3	13,3	66,6	20,0	13,3

Para este estudo, apenas a estirpe UFPEDA-563 promoveu emulsificação valores superior a 90%. Esse resultado pode ter sido influenciado pela fonte de carbono aplicada para a produção do ramnolipídeo. A fonte de carbono utilizada pode alterar a estrutura dos biossurfactantes produzidos e, conseqüentemente, suas propriedades emulsificantes. Essas mudanças podem ser benéficas quando se desejam propriedades específicas para uma aplicação direcionada (Desai e Banat, 1997; Santos et al., 2002).

Esses resultados demonstram que os ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* apresentam uma boa capacidade emulsificante. Essa característica confirma a viabilidade de desenvolvimento de diferentes aplicações, sobretudo as ambientais, tais como processos de biorremediação (Nistsche et al., 2005b).

4.3.3. Caracterização do biossurfactante por LCMS-IT-TOF

Os principais homólogos encontrados na mistura de ramnolípídeo correspondem aos mono-ramno-mono-lípídeo, mono-ramno-di-lípídeo, di-ramno-mono-lípídeo e di-ramno-di-lípídeo, dos quais foram detectados ao final dos tempos de cultivo de cada estirpe (Tabela 3). Os resultados demonstram que as condições utilizadas no presente trabalho parecem favorecer a produção de mono-ramno-di-lípídeo, predominante nas amostras. Resultados semelhantes foram encontrados por Lotfabad et al. (2010) e Bharali e Konwar, (2011) que descreveram o homólogo mono-ramno-di-lípídeo como predominante.

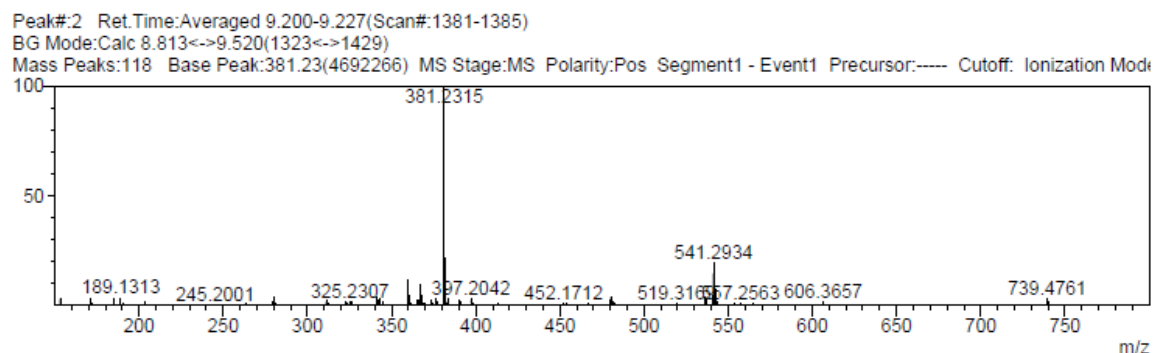
Tabela 3: Caracterização dos análogos de ramnolípídeo nas amostras analisadas.

Substância/ Massa molecular	Estirpe bacteriana UFPEDA					
	559	563	564	571	572	614
Mono- ramno-mono-lípídeo						
Rha-C ₁₀ /(333)	-	-	-	X	X	-
Rha-C ₁₂ /(381)	-	X	-	X	X	-
Mono- ramno-di-lípídeo						
Rha-C ₁₀ -C ₁₀ /(541)	-	X	-	X	X	-
Rha-C ₁₀ -C ₁₂ ou Rha-C ₁₂ -C ₁₀ /(555)	-	X	-	X	X	X
Rha-C ₈ -C ₁₀ ou Rha-C ₁₀ -C ₈ /(475)	-	X	-	-	-	-
Rha-C ₁₄ -C ₁₄ /(615)	-	X	-	X	X	-
Rha-C ₁₂ -C ₁₄ ou Rha-C ₁₄ -C ₁₂ /(587)	-	X	-	-	-	-
Rha-C ₁₆ -C ₁₄ ou Rha-C ₁₄ -C ₁₆ /(641)	-	-	-	-	X	-
Di- ramno- mono -lípídeo						
Rha-Rha- C ₁₀ /(479)	-	-	-	X	-	-
Di- ramno-di-lípídeo						
Rha-Rha-C ₈ -C ₁₀ ou Rha-Rha-C ₁₀ -C ₈ /(621)	-	-	-	X	-	-
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀ /(689)	-	X	-	-	-	-
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂ ou Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₀ /(699)	-	X	-	-	X	-
Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₂ /(701)	-	-	-	-	-	-

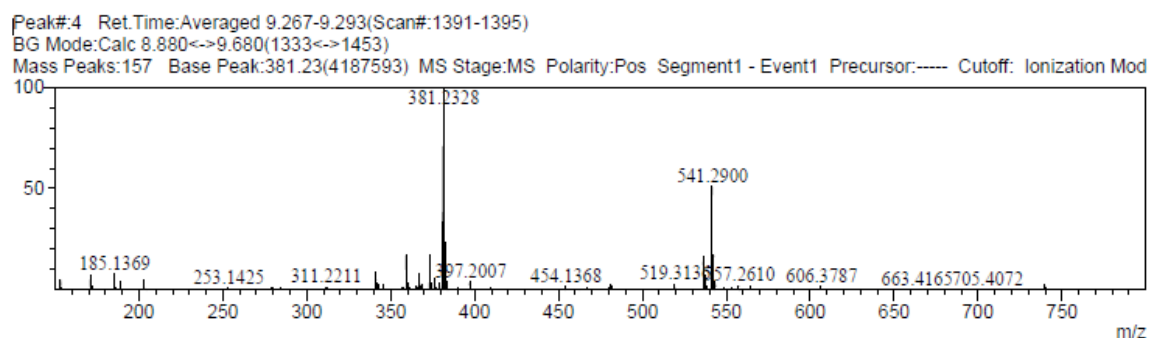
X : presença; - : ausência

As análises de espectrometria de massa (Figura 11) revelaram a presença de mono-ramno-mono-lipídeo (Rha-C₁₂), razão massa-carga (m/z) de 381 m/z e o mono-ramno-di-lipídeo (Rha-C₁₀-C₁₀) (m/z 541), sendo predominante em três dentre as seis amostras analisadas, entre os tempos de 8 e 9 minutos.

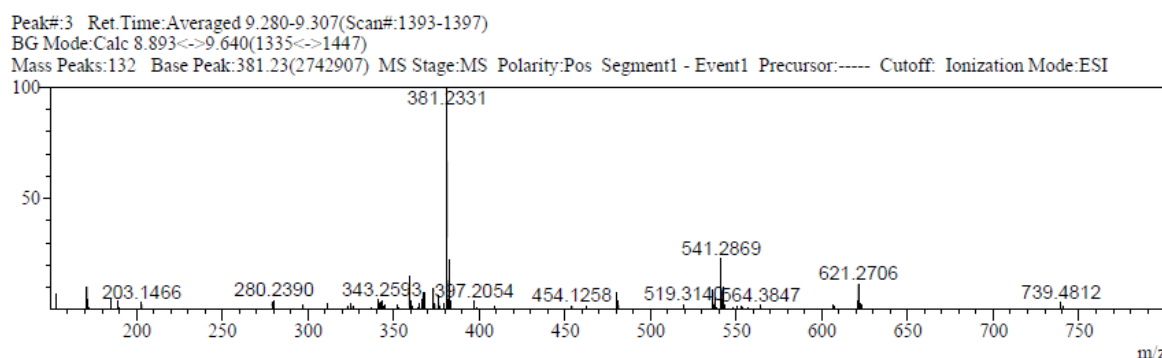
Figura 11: Espectro de massa dos ramnolipídeos produzidos por estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA- 563, UFPEDA-571 e UFPEDA-572, isoladas de poços de petróleo.



MS Spectrum Graph



m/z



MS Spectrum Graph

Sim et al. (1997), Costa et al. (2006) e Bharali e Konwar (2011) descreveram que durante o processo de produção de ramnolípídeo há uma mistura de homólogos, onde o mono-ramno-di-lípídeo (Rha-C₁₀-C₁₀) é predominante. Diferentemente, para este estudo o homólogo mono-ramno-di-lípídeo (Rha-C₁₀-C₁₂ ou Rha-C₁₂-C₁₀) foi o ramnolípídeo mais abundante dentre as linhagens investigadas. Produzido por quatro linhagens (UFPEDA-563; UFPEDA-571; UFPEDA-572 e UFPEDA-614), sendo o Rha-C₁₀-C₁₀ o segundo homólogo mais produzido pelas estirpes de *Pseudomonas* investigadas. A predominância do Rha-C₁₀-C₁₀ em outros estudos pode ter sido resultado de diferenças na composição do substrato ou, mais provavelmente, das condições específicas da estirpe da *P. aeruginosa* (Costa et al., 2006).

A estirpe UFPEDA-563 foi a estirpe bacteriana que produziu mais homólogos de ramnolípídeo (Tabela 3), corroborando com uma maior produção (3,2 g/L) e os maiores índices de emulsificação (93%).

Alguns homólogos foram produzidos especificamente por uma única estirpe; mais frequentemente os homólogos com duas moléculas de raminose e apenas um ácido (mono-ramno-mono-lípídeo), como os homólogo Rha-Rha-C₁₀ produzido pela estirpe UFPEDA-571. Esta foi a única estirpe bacteriana que produziu o homólogo di-ramno-mono-lípídeo (Rha-Rha-C₁₀); enquanto que a estirpe bacteriana UFPEDA-614 produziu apenas o mono-ramno-di-lípídeo (Rha-C₁₀-C₁₂). As estirpes UFPEDA-559 e UFPEDA-564, não apresentaram homólogos com áreas altas dos picos, havendo somente picos bastante baixos e em menores quantidades. No entanto, a produção do ramnolípídeo foi efetiva.

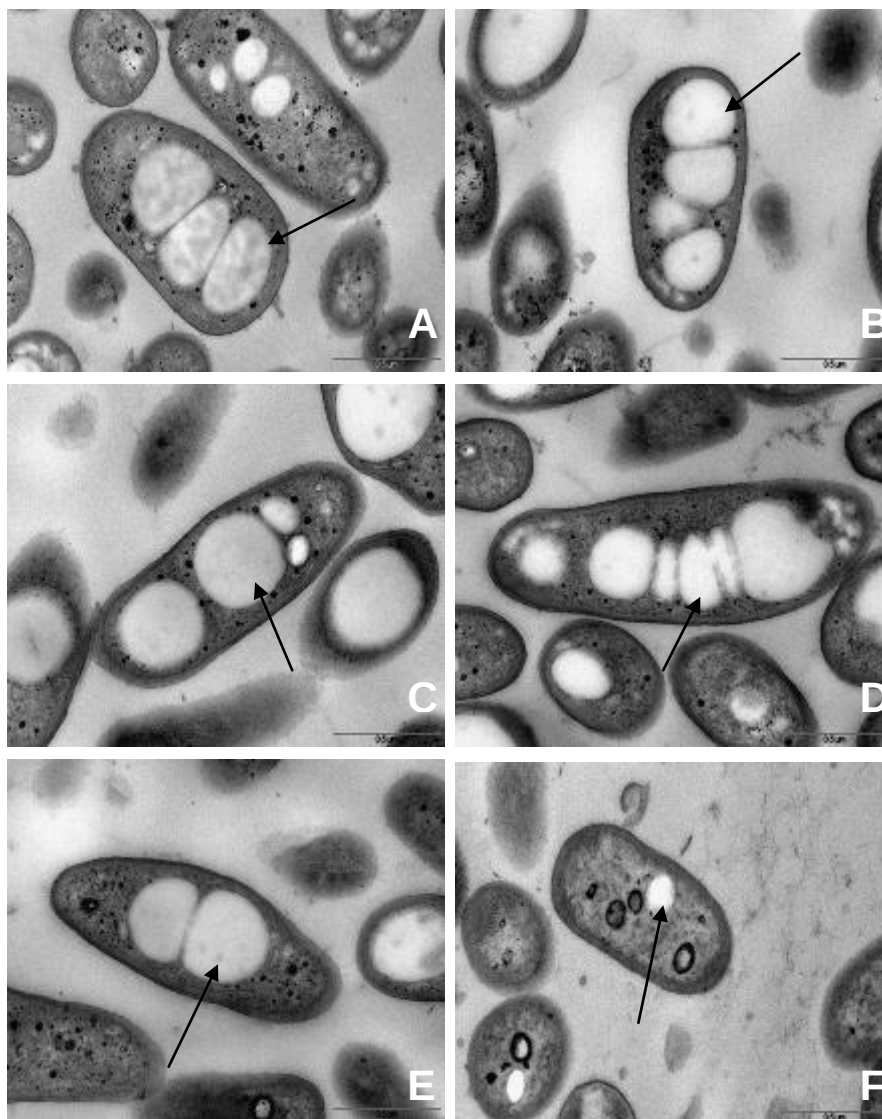
Diversos autores publicaram trabalhos com diferentes homólogos de ramnolípídeos produzidos por *P. aeruginosa*, dentre eles: Abalos et al. (2001); Mata-Sandoval e Karns (2001); Haba et al. (2000); Benincasa et al. (2004); Monteiro et al. (2007); Lotfabad, et al. (2010); Sarachat et al. (2010); Bharali e Konwar (2011). Entretanto, os ramnolípídeos produzidos diferiram na quantidade e estrutura, dependendo da fonte de carbono utilizada.

Os ramnolípídeos produzidos por *P. aeruginosa* são uma mistura de homólogos que diferem na estrutura, dependendo da estirpe bacteriana utilizada. O conhecimento detalhado das propriedades biológicas de um biossurfactante é importante para a seleção de compostos com as propriedades desejadas para utilizações específicas (Sánchez et al., 2010).

4.3.4. Caracterização de polihidroxialcanoatos em microscopia eletrônica de transmissão

Alguns trabalhos reportam que bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* são capazes de acumular polihidroxialcanoatos (PHA) no interior de suas células (Hori et al., 2002; Pham et al., 2004). Altos níveis de acumulação de PHA foram observados, ao microscópio eletrônico de transmissão, na forma de grânulos de PHA em todas as estirpes bacterianas testadas (Figura 12).

Figura 12: Inclusões de PHA no interior das células (setas) de *Pseudomonas aeruginosa* vistas no aumento de 0,5 μ m em microscópio eletrônico de transmissão. (A): *P. aeruginosa* UFPEDA-559; (B): *P. aeruginosa* UFPEDA-563; (C): *P. aeruginosa* UFPEDA-564; (D): *P. aeruginosa* UFPEDA-571; (E): *P. aeruginosa* UFPEDA-572; (F): *P. aeruginosa* UFPEDA-614



Durante o cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* com a produção de ramnolipídeos, também foram produzidos PHA intracelulares. Esta produção simultânea está relacionada a uma alta atividade metabólica devido à ação catalítica do polipeptídeo RhlA. Este, além de estar envolvido na síntese de ramnolipídeos, também está envolvido na produção de um intermediário de PHA (Vidal-Max et al., 2001; Soberón-Chávez et al., 2005).

Visualmente, percebe-se que a estirpe UFPEDA-614 (Figura 12) é a estirpe que menos apresenta grânulos no interior das células. Esses resultados assemelham-se aos resultados da produção dos ramnolipídeo, onde a estirpe UFPEDA-614 foi a que apresentou a menor concentração de ramnolipídeo, o que sugere que a produção dos PHA pode estar associada à produção dos ramnolipídeos.

As estirpes bacterianas produziram os PHA de forma heterogênea em relação ao tamanho dos grânulos, provavelmente porque a sua formação e acumulação não são expressos uniformemente entre as populações de *Pseudomonas aeruginosa*.

Embora a estrutura dos PHA não tenha sido caracterizada, análogos de PHA podem ser esperados quando são observadas as inclusões em microscópio eletrônico (Vidal-Max et al., 2001).

A co-produção entre os ramnolipídeos e os polihidroxialcanoatos sugere que as linhagens estudadas são promissoras no ponto de vista ambiental e tecnológico, visto que são capazes de consumir um rejeito da refinaria do biodiesel, como o glicerol, produzindo PHA que possui um alto valor agregado.

4.3.5. Ensaio de ecotoxicidade aguda

Biossurfactantes são conhecidos por sua baixa toxicidade em comparação com os surfactantes sintéticos (Sánchez et al., 2010). Testes de toxicidade podem ser definidos como procedimentos nos quais as respostas de organismos-teste são utilizadas para detectar ou avaliar os efeitos adversos ou não de uma ou mais substâncias sobre os sistemas biológicos. Estes testes constituem na exposição de organismos a diferentes tratamentos, os quais tentam simular o ambiente natural, visando assim a detectar possíveis efeitos letais (Laitano e Matias, 2006).

Segundo a normativa da ABNT NBR 12713, uma amostra apresenta toxicidade aguda quando o fator de toxidade é > 1 . Os juvenis de *Daphia magna* utilizadas neste estudo apresentaram sensibilidade aguda, ou seja, houve a morte de ao menos 50% dos

animais, para todas as amostras analisadas quando submetidas ao mosto fermentado, livre de células, inclusive para o controle negativo, onde foi considerado apenas o meio de cultura sem inoculação de micro-organismos. Esse fato pode ser atribuído à presença de outros fatores de toxicidade, tais como: a quantidade de glicerol; a quantidade de sais e metabólitos extracelulares como lipases, piocianinas e ácidos orgânicos produzidos durante o processo.

Santa Anna et al., (2002) verificaram resultados semelhantes a este estudo, onde o meio de fermentação apresentou um elevado nível de toxicidade, atribuindo o fato ao aumento da produção de metabólitos com características virulentas. Bharali e Konwar (2011) também encontraram toxicidade no biossurfactante, o qual apresentou uma significativa atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*.

Diferentemente, Gustafsson et al. (2009) observaram que nenhum efeito foi constatado no microcrustáceo *Daphnia magna*, quando usado um biossurfactante da família dos glicolipídeos produzido por *P. aeruginosa*. Esses resultados sugerem que o risco de efeitos secundários indesejados sobre organismos aquáticos pode ser baixo, e pode estar associado à produção de outros metabólitos, diferentes dos ramnolipídeos, que apresentem características de toxicidade.

4.4. CONCLUSÕES

O glicerol proveniente da refinaria do biodiesel é promissor para a produção de metabólitos tensoativos como os ramnolipídeos, produzidos pelas estirpes de *P. aeruginosa*. Além disso, a estirpe UFPEDA-563 foi a que apresentou a maior capacidade emulsificante e a que mostrou uma melhor produção com valores acima de 3 g/L de ramnolipídeo no tempo de 120 horas, estando associada ao crescimento celular.

Apenas a estirpe UFPEDA-563 apresentou um índice de emulsificação, com uma emulsão estável e valores de 93% para o óleo diesel.

O homólogo mono-ramno-di-lipídeo (Rha-C₁₀-C₁₂ ou Rha-C₁₂-C₁₀) foi o ramnolipídeo predominante nas amostras investigadas.

Altos níveis de acumulação de PHA foram observados na forma de grânulos.

O ramnolipídeo apresentou toxicidade aguda para juvenis de *Daphnia magna* em todas as amostras analisadas, inclusive para o controle negativo.

4.5. REFERÊNCIAS

Abalos, A.; Pinazo, A.; Infante, M. R.; Casals, M.; Garcia, F.; Manresa, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*. v. 17, p. 1367-1371, 2001.

Accorsini, F. R.; Mutton, M. J. R.; Lemos, E. G. M.; Benincasa, M. Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 43(1), p.116-125, 2012.

Amaral, P. F. F.; Silva, J. M.; Lehocky, B. M.; Barros-Timmons, A. M. V.; Coelho, M. A. Z.; Marrucho, I. M.; Coutinho, J. A. P. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*. v. 41, p.1894-1898, 2006.

Anderson, A. J.; Dawes, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiology. Reviews*. v. 54, p. 450-472, 1990.

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Norma Técnica NBR12713. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera), Rio de Janeiro, 2004.

Benincasa, M.; Abalos, A.; Oliveira, I; Manresa, A. Chemical structure, surface properties and biological actives of the biosurfactante produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antoniie Van Leeuwenhoek*. v. 85, p. 1-8, 2004.

Berenchtein, B.; Costa, L. B.; Braz, D. B.; Almeida, V. V.; Tse, M. L. P.; Miyada, V. S. Utilização de glicerol na dieta de suínos em crescimento e terminação. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.39 (7), p.1491-1496, 2010.

Bharali, P.; Konwar, B. K. Production and Physico-chemical Characterization of a Biosurfactant Produced by *Pseudomonas aeruginosa* OBP1 Isolated from Petroleum Sludge. *Applied Biochemistry Biotechnology*. v. 164, p. 1444-1460, 2011.

Cooper, D. G.; Goldenberg, B. G. Surface active agents from two *Bacillus* species. *Applied Environmental Microbiology*. v. 53 (2), p.224-229, 1987.

Costa, S. G. V. A. O.; Nitschke, M.; Haddad, R.; Eberlin, M. N.; Contiero, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Process Biochemistry*. v. 41, p.483–488, 2006.

Desai, A. J.; Banat, I. M. Microbial production of surfactant and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v.61, p.47-64, 1997.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J.K., Rebers, Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Chemistry*. v. 28, p.350-356, 1956.

Gustafsson, S.; Hultberg, M.; Figueroa, R. I.; Rengefors, K. On the control of HAB species using low biosurfactant concentrations. *Harmful Algae*. v. 8, p. 857–863, 2009.

Haba, E.; Espuny, M. J.; Busquets, M.; Manresa, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *Journal of Applied Microbiology*. v. 88, p. 379-387, 2000.

Hori, K.; Marsudi, S.; Unno, H. Simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnology Bioengineering*. v. 78 (6) p.699-707, 2002.

Laitano, K. S.; Matias, W. G. Testes de toxicidade com *Daphnia magna*: Uma ferramenta para avaliação de um reator experimental UASB. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*. v. 1 (1), p.43-47, 2006,

Lotfabad, T. B.; Abassi, H.; Ahmadkhaniha, R.; Roostaazad, R.; MasOomi, F.; Zahiri, H. S.; Ahmadian, G.; Hojatollah, V.; Noghabi, K. A. Structural characterization of a

rhamnolipid-type biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MR01: Enhancement of di-rhamnolipid proportion using gamma irradiation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. v. 81, p. 397-405, 2010.

Maneerat, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable resources. Songklanakarin Journal Science Technology. v. 27(3), p. 675–683, 2005.

Mata-Sandoval, J. C.; Karns, T. Effect of nutritional and environmental conditions on composition of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UG2. Microbiology Research. v. 155, p. 249-256, 2001.

Monteiro, S. A.; Sassaki, G. L.; Souza, L. M.; Meira, J. A. ; Araújo, J. M.; Mitchell, D. A.; Ramos, L. P.; Krieger, N. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUFPE 614. Chemistry and Physics of Lipids. v. 147, p. 1-13, 2007.

Nitschke, M.; Costa, S.G.V.A.O. Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. Biotechnology Progress. v. 21 (6), p. 1593-1600, 2005a.

Nitschke, M.; Costa, S.G.V.A.O.; Contiero, J. Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on *Pseudomonas* derived molecules of increasing industrial interest. Process Biochemistry. v. 46, p.621–630, 2011.

Nitschke, M.; Costa, S.G.V.A.O.; Haddad, R.; Gonçalves, L.A.G.; Eberlin,M.; Contiero, J. Oil waste as unconventional substrate for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. Biotechnological Progress. v. 21, p.1562-1566, 2005b.

Pantazaki, A. A.; Papaneophytou, C. P.; Lambropoulou, D. A. Simultaneous polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids production by *Thermus thermophilus* HB8. AMB Express. v.1, p. 1-13, 2011.

Pham, T.H.; Webb, J.S.; Rehm, B.H.A. The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiology*. v. 150, p. 3405–3413, 2004.

Pirôllo, M. P. S.; Mariano, A. P.; Lovaglio, R. B.; Costa, S. G. V. A. O.; Walter, V.; Hausmann, R.; Contiero. Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site. *Journal of Applied Microbiology*. v. 105, p.1484-1490, 2008.

Prieto, L. M.; Michelon, M.; Burkert, J. F. M.; Kalil, S. J.; Burkert, C. A. V. The production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coastal zone in Brazil. *Chemosphere*. v. 71, p.1781-1785, 2008.

Rooney, A. P.; Prince, N. P. J.; Ray, K. J.; Kuo, T. M. Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. *FEMS Microbiology Letters*. v. 295 (1), p. 82-87, 2009.

Sánchez, M.; Aranda. F. J.; Teruel, J. A.; Espuny, M. J.; Marqués, A.; Manresa, A.; Ortiz, A. Permeabilization of biological and artificial membranes by a bacterial dirhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Colloid and Interface Science*. v.341, p.240–247, 2010.

Santa Anna, L. M. ; Sebastian, G.V.; Menezes, E. P. ; Alves, T. L. M.; Santos, A. S.; Pereira-Júnior, N.; Freire, D. M. G. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. v. 19 (2), p.159-166, 2002.

Santa Anna, L. M.; Sebastian, G.V.; Pereira-Júnior, N.; Alves, T. L. M.; Menezes, E. P.; Freire, D. M. G. Production of biosurfactants from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA₁. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 91-93 (1-9), p.459-467, 2001.

Santos, A. S.; Sampaio, A. P. W.; Vasquez, G. S.; Santa Anna, L. M.; Pereira-Junior, N.; Freire, D. M. G. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production

of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Applied Biochemistry Biotechnology. v. 98-100, p.1025-1035, 2002.

Sarachat, T.; Pornsunthorntawe, O.; Chavadej, S.; Rujiravanit, R. Purification and concentration of a rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using foam fractionation. Bioresource Technology. v. 101, p.324–330, 2010.

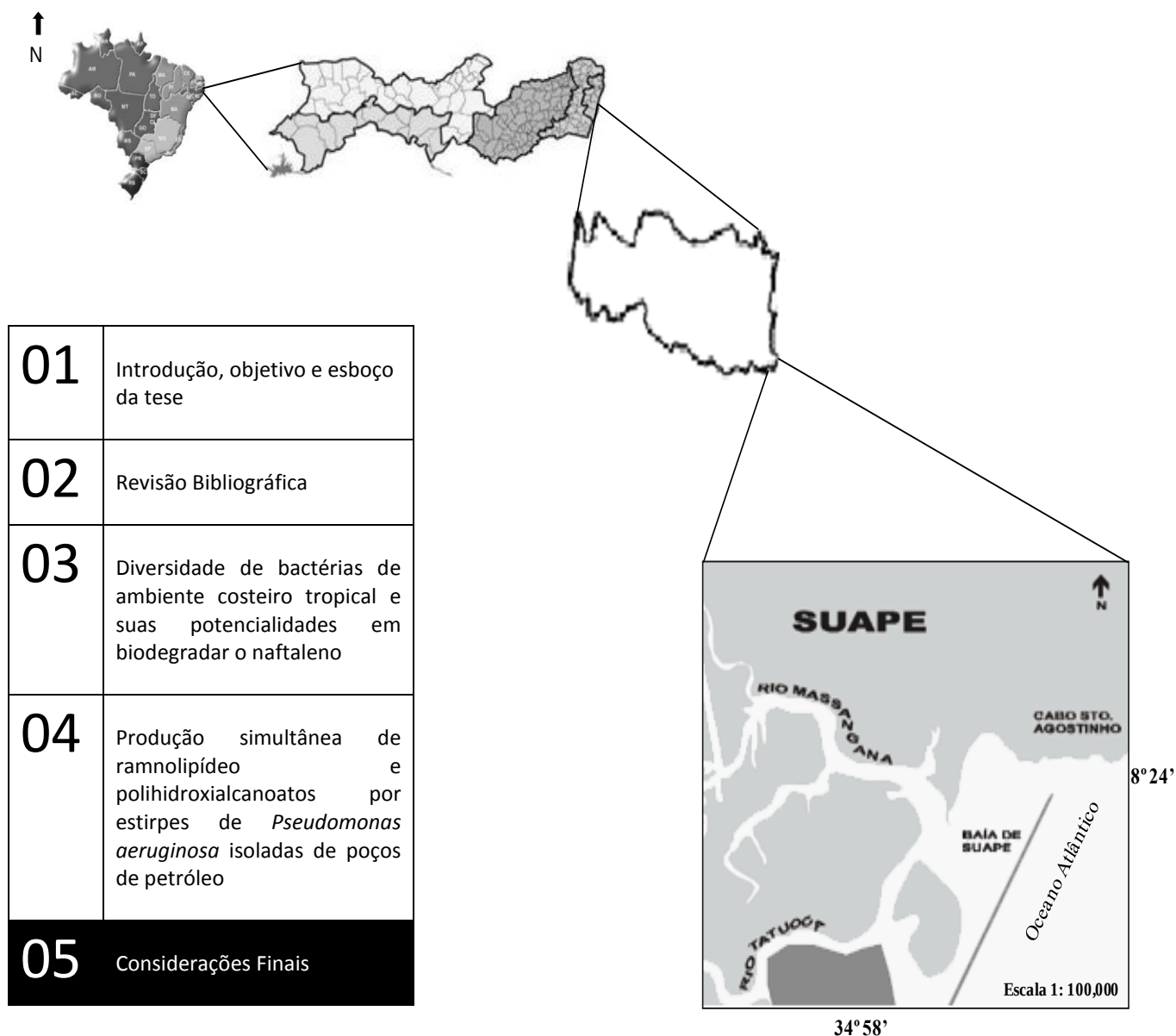
Sim, L.; Ward, O. P.; Li, Z. Y. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology. v. 19 (4), p.232–8, 1997.

Singh, A.; Van Hamme, J. D.; Ward, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. Biotechnology Advances. v.25 (1), p.99-121, 2007.

Soberón-Chávez, G.; Aguirre-Ramírez, M.; Sánchez, R. The *Pseudomonas aeruginosa* RhlA enzyme is involved in rhamnolipid and polyhydroxyalkanoate production. Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology. v. 32 (11-12), p. 675-677, 2005.

Vasileva-Tonkava, E. ; Sotirova, A. ; Galabova, D. The Effect of Rhamnolipid Biosurfactant Produced by *Pseudomonas fluorescens* on Model Bacterial Strains and Isolates from Industrial Wastewater. Current Microbiology. v. 62, p. 427- 433, 2011.

Vidal-Max, J.; Resina-Pelfort, O.; Haba, E.; Comas, J.; Manresa, A.; Vives-Rego, J. Rapid flow cytometry – Nile red assessment of PHA cellular content and heterogeneity in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCIB 40044) grown in waste frying oil. Antonie van Leeuwenhoek. v. 80, p. 57-63, 2001.



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A praia de Suape e regiões adjacentes detêm um grande aporte turístico e econômico e possuem diversas comunidades que dependem da pesca e turismo. Em 2010, uma refinaria de petróleo teve sua construção iniciada nas adjacências da praia de Suape e estará em operação a partir de 2013. Assim, o risco de derrame de hidrocarbonetos poliaromáticos na baía de Suape, é considerado realista. Um possível derrame de petroderivados pode vir a causar um dano inigualável de amplo impacto ambiental, fortemente negativo sobre a área. Assim, o desenvolvimento de estratégias de biorremediação surge como recurso para minimizar tais danos.

Os micro-organismos isolados da praia de Suape são tolerantes ao naftaleno em concentrações de 30 mg/L no entanto, não apresentam capacidade genética para biodegradá-lo; assim como ao catecol, seu principal intermediário de degradação. Entre as bactérias encontradas nas areias da praia de Suape, incluem os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Cellulomonas* e *Arthrobacter*, sendo o gênero *Microbacterium* o mais abundante.

O glicerol proveniente da refinaria do biodiesel é promissor para a produção de metabólitos tensoativos, como os ramnolipídeos produzidos pelas estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*. A maior concentração do ramnolipídeo está associada ao crescimento celular. Apenas a estirpe UFPEDA-563 apresentou um índice de emulsificação favorável, com uma emulsão estável e valores de 93% para o óleo diesel. O homólogo mono-ramno-di-lipídeo (Rha-C₁₀-C₁₂ ou Rha-C₁₂-C₁₀) foi o ramnolipídeo predominante nas amostras investigadas. Altos níveis de acumulação de PHA foram observados na forma de grânulos.

Por serem substâncias xenobióticas, o petróleo e seus derivados são considerados recalcitrantes ao meio ambiente. Assim, malefícios como: mortalidade de peixes, aves, mamíferos, organismos bentônicos e planctônicos são possíveis consequências do efeito do derrame de hidrocarbonetos de petróleo no ecossistema marinho, desencadeando um desequilíbrio ecológico em curto prazo. Este projeto visou fornecer dados sobre o potencial de biodegradação de micro-organismos nativos das areias da praia de Suape; e avaliar a produção do biossurfactante ramnolipídeo, a partir do glicerol, rejeito da fábrica do biodiesel, com a hipótese de se desenvolver a biorremediação, *ex situ*, através da adição de ramnolipídeos produzidos por micro-organismos isolados de poços de petróleo. Dessa forma, com os resultados obtidos,

contribuem para melhorar a compreensão do ambiente costeiro da praia de Suape e gerar conhecimento acadêmico especializado sobre a referida temática.