

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE
PETRÓLEO E PRODUTORAS DE BIOSURFACTANTES A
PARTIR DO SEDIMENTO DO MANGUEZAL RIO PARAÍBA DO
SUL - RIO DE JANEIRO**

Aryane Barcelos Maciel

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO

Campos dos Goytacazes

Novembro 2009

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO E PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTES A PARTIR DO SEDIMENTO DO MANGUEZAL RIO PARAÍBA DO SUL - RIO DE JANEIRO

Aryane Barcelos Maciel

Monografia apresentada à Universidade Estadual do Norte Fluminense, na área de concentração em Ciências Ambientais, como parte das exigências para a obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dr^a Adriana Daudt Grativol

Co-orientador: Dr. Carlos Eduardo de Rezende

Campos dos Goytacazes

Novembro de 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCI RIBEIRO

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO E PRODUTORAS
DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DO SEDIMENTO DO MANGUEZAL RIO
PARAÍBA DO SUL - RIO DE JANEIRO**

ARYANE BARCELOS MACIEL

Monografia apresentada à Universidade Estadual do Norte Fluminense, na área de concentração em Ciências Ambientais, como parte das exigências para a obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Monografia aprovada em 25 de novembro de 2009

Comissão examinadora:

Prof.^a Dr.^a Adriana Daudt Grativol (Orientadora)

Prof.^a Dr.^a Valdirene Moreira Gomes (LFBM/ CBB)

MSc. Rita Maria da Costa Wetler Tonini (LCA/ CBB)

Prof. Dr. Olney Vieira da Motta (LSA/ CCTA)

DEDICATÓRIA

Às pessoas que não mediram esforços para que eu alcançasse esta vitória: meus pais Alcides e Lia Jane, meus grandes amores.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu forças e sabedoria para vencer esta etapa na minha vida.

À minha orientadora Adriana Daudt Grativol pela orientação, amizade e apoio, por compartilhar comigo muito do seu conhecimento e por ter me aberto portas para o caminho científico. Muito Obrigada!

Ao meu co-orientador prof. Carlos Eduardo de Rezende pela orientação e apoio durante minha iniciação científica. Muito Obrigada!

À Rita Wetler e à Albany Marchetti, pelos momentos de companheirismo, de ensinamentos, de amizade e por sempre estarem prontas para me ajudar. Muito Obrigada!

À prof.^a Valdirene Moreira Gomes e ao prof. Olney Vieira Motta por terem aceitado o convite para avaliar este trabalho.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Transferência de Materiais Continente-Oceano (INCT) (CNPq Proc.: 573.601/2008-9), pelo apoio financeiro concedido.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) que financiou a minha bolsa de iniciação científica, que foi muito bem-vinda. Muito Obrigada!

Aos amigos de Laboratório, Albany, Aline, Andréia, Carol, Juliana, Lucas e Rita, pelas conversas descontraídas, pelas risadas e amizade.

Às amigas de república, Andréia Magro e Carol Medeiros, pela amizade, pelos momentos de descontração e apoio emocional nos momentos difíceis. Vocês me ajudaram muito durante todo esse período. Muito obrigada!

À todo o corpo docente do curso de Ciências Biológicas e aos técnicos e funcionários do Laboratório de Ciências Ambientais.

À minha família, que sempre acreditou em mim e me motivou a executar cada passo deste trabalho. Ao Johnathan Gomes, pela força diária e pelo amor mesmo distante.

SUMÁRIO

	pág
Lista de figuras.....	viii
Lista de tabelas.....	ix
Siglas e abreviaturas empregadas.....	x
Resumo	xi
Abstract	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Manguezal.....	1
1.2. Poluição por petróleo em manguezais.....	2
1.3. Biorremediação.....	5
1.4. Degradação microbiana de hidrocarbonetos.....	7
2. MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1. Área de estudo.....	10
2.2. Coleta da amostra.....	11
2.3. Análises físicas e químicas do sedimento.....	12
2.4. Seleção de microrganismos com potencial de biodegradação dos compostos de petróleo.....	12
2.4.1 Tratamento da amostra antes da incubação com petróleo.....	12
2.4.2 Tratamento da amostra antes depois da incubação com petróleo....	13
2.5 Teste para avaliar a capacidade de produção de biossurfactantes...	14
2.6 Análise estatística.....	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1. Análises físicas e químicas do sedimento.....	17
3.2. Contagem de microrganismos em placas com meio para heterotróficos totais (HT).....	18
3.3. Contagem de microrganismos em placas com meio para degradadores de petróleo.....	21

3.4.	Influência do meio de cultura no crescimento e na contagem dos microrganismos cultiváveis.....	22
3.5.	Teste de colapso de gota para averiguar a capacidade dos isolados em produzir biossurfactantes.....	25
4.	CONCLUSÕES.....	27
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Fig. 1 Classificação estrutural de alguns componentes do petróleo.....	3
Fig. 2 Localização da área de estudo no manguezal do estuário do rio Paraíba do Sul, Estado do Rio de Janeiro.....	11
Fig. 3 Esquema ilustrativo do isolamento dos microrganismos que cresceram em placas de petróleo em placas de ágar nutritivo e posterior estoque dos mesmos.....	14
Fig. 4 Esquema da padronização dos inóculos com o cartão de Wickerham.....	15
Fig. 5 Colapso da gota.....	16
Fig. 6 Médias das contagens em placas de heterotróficos totais antes e depois da incubação da amostra de sedimento com petróleo.....	19
Fig. 7 Médias das contagens em placas de petróleo antes e depois da incubação da amostra de sedimento com petróleo.....	21
Fig. 8 Box plot demonstrando o resultado da ANOVA realizada para as contagens de microrganismos da amostra coletada, cultivadas em meio HT e em meio seletivo para degradadores de petróleo..	23
Fig. 9 Box plot demonstrando o resultado da ANOVA realizada para as contagens de microrganismos no dia 0 para a amostra coletada, cultivadas em meio HT e em meio seletivo para degradadores de petróleo.....	24

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tab. 1 Razões diagnósticas calculadas e seus limites.....	18
Tab. 2 Resultado das Razões diagnósticas calculadas nas amostras.....	18

SIGLAS E ABREVIATURAS EMPREGADAS

ELISA- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

HAP- Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

HT- Heterotróficos totais

HT A- Placas de heterotróficos antes da incubação com petróleo

HT D- Placas de heterotróficos depois da incubação com petróleo

MEOR- Microbial Enhanced Oil Recovery

NOAA- National Oceanic and Atmospheric Administration

PCR- Polymerase Chain Reaction

PA- Placas contendo petróleo antes da incubação do mesmo

PD- Placas contendo petróleo depois da incubação do mesmo

SDS- Dodecil sulfato de sódio

TEL- Threshold Effect Level

TSB- Triple Soy Broth

UFC- Unidade Formadora de Colônia

RESUMO

Os manguezais são ecossistemas que ao longo dos anos vêm sofrendo com grandes impactos de influência antropogênica. Este ambiente possui uma grande facilidade em acumular poluentes como hidrocarbonetos do petróleo, devido a algumas características como condições anaeróbicas do sedimento e alta produção de matéria orgânica. A biorremediação é um importante processo que tem como objetivo reduzir os impactos causados por esses poluentes através de microrganismos que tem a capacidade de degradar esses contaminantes, levando a formação de CO₂, H₂O e biomassa. Os objetivos desse trabalho concentram-se em isolar bactérias que utilizem petróleo como única fonte de carbono e verificar se há bactérias produtoras de biossurfactantes no sedimento do manguezal do estuário do rio Paraíba do Sul. De acordo com a análise dos hidrocarbonetos do sedimento, concluiu-se que neste estuário há uma dominância de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) oriundos da combustão ou de biomassa e, portanto, não houve indicativos de hidrocarbonetos de procedência petrogênica. A partir dos experimentos realizados, observou-se a contagem em placas de heterotróficos totais variando de 10⁹ a 10¹¹ UFC.g⁻¹ de sedimento para a amostra antes da incubação com petróleo (HT A), e, após a incubação (HT D), a contagem passou para 10⁸ a 10¹⁰ UFC.g⁻¹ de sedimento. Assim, foi possível constatar uma diminuição na contagem de heterotróficos após a exposição do sedimento ao poluente. Em outro experimento para contagem de microrganismos em placas com meio para degradadores de petróleo, obteve-se uma contagem que variou entre 10⁷ a 10⁹ UFC.g⁻¹ de sedimento para a amostra antes da incubação com petróleo (PA) e, após a incubação (PD), a contagem passou para 10⁷ a 10¹⁰ UFC.g⁻¹ de sedimento. Os isolados foram submetidos ao teste de colapso da gota para averiguar a capacidade de produzir biossurfactante. Das 94 colônias bacterianas isoladas 78 apresentaram capacidade de produzir biossurfactantes, perfazendo aproximadamente 83% das bactérias isoladas. Concluiu-se que o sedimento do manguezal estudado possui microrganismos com potencial para biodegradação. Dessa forma, o estudo destes constitui uma importante ferramenta para buscar soluções que minimizem o impacto causado por derramamentos acidentais de petróleo no ambiente.

Palavras-chave: Manguezal, biodegradação, petróleo, biossurfactantes.

ABSTRACT

Mangrove forests are ecosystems that over the years have suffered with major impacts of anthropogenic influences. This environment has a great facility to accumulate pollutants such as petroleum hydrocarbons, because of some characteristics such as anaerobic conditions and high production of organic matter. Bioremediation is an important process that aims to reduce the impacts of these pollutants by microorganisms that has the ability to degrade these contaminants leading to formation of CO₂, H₂O and biomass. The objectives of this work concentrated on isolating bacteria that use oil as sole carbon source and check for biosurfactant-producing bacteria in the sediment of the estuary of the Paraíba do Sul. The sediment was analyzed for hydrocarbons and it was found a dominance of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) resulting from combustion or biomass. There were no indications of hydrocarbons from petrogenic origin. The plate count of total heterotrophic ranged from 10⁹ to 10¹¹ CFU g⁻¹ sediment in the sample before incubation with oil (HT A) and after the oil exposure (HT D), the count rose to 10⁸ to 10¹⁰ CFU g⁻¹ sediment. Thus, there has been a decrease in heterotrophic counts after exposure to the poluent. The plate count of bacteria that could degrade petroleum resulted in a score ranging from 10⁷ to 10⁹ CFU g⁻¹ sediment in the sample before incubation with oil (PA) After incubation (PD), the count rose to 10⁷ to 10¹⁰ CFU g⁻¹ sediment. Isolates of petroleum degraders were tested by the technique of the drop collapse to determine their ability to produce biosurfactant. Of the 94 bacterial colonies isolated, 78 showed the ability to produce biosurfactants, making up approximately 83% of isolates. It was concluded that the sediment of the studied mangrove has microorganisms with biodegradation potential. Therefore, the study of these microorganisms could be an important tool to find solutions that minimize the impact caused by accidental spills of oil into the environment.

Key words: Mangrove, biodegradation, petroleum, biosurfactant.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Manguezal

O manguezal é um ecossistema de transição entre os ambientes terrestre e marinho, onde ocorre o encontro das águas dos rios com a água do mar, como por exemplo, nas margens de baías, enseadas, barras, desembocaduras de rios, lagunas e reentrâncias costeiras. É um ambiente característico de regiões tropicais e subtropicais (CURY, 2002). Essas regiões são áreas críticas, onde a biodiversidade e os recursos biológicos estão ameaçados de extinção (ZHANG *et al.*, 2004).

Ecossistemas de mangue possuem grande importância relacionada aos serviços ambientais que oferece como a manutenção da qualidade da água, fixação do sedimento, fornecimento de produção primária para os ambientes adjacentes e manutenção da biodiversidade. Além desses importantes serviços ambientais, os manguezais exercem função de berçário e área de abrigo para crescimento de várias espécies de peixes e de espécies de grande importância econômica (BENFIELD *et al.*, 2005; SCHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 2000; HEGAZY, 1998). Através da decomposição e da serapilheira sobre o sedimento, os manguezais contribuem para a formação da cadeia trófica, fazendo com que os ecossistemas costeiros permaneçam em um estado ativo, devido à grande atividade biológica e à reserva de nutrientes e energia em longo prazo (LIZÁRRAGA *et al.*, 2004; HEGAZY, 1998).

Os manguezais são ambientes com elevado teor de nutrientes, onde, sob os solos, há uma grande quantidade de material vegetal parcialmente decomposto. No sedimento, a quantidade de nutrientes geralmente muda ao longo da zona intertidal. Essa variação se deve principalmente à constante inundação pelas marés (LACERDA *et al.* 1985) e ao nível de condensação do sedimento, que é influenciado através do potencial redox e pode ser afetado pela mudança na forma e na disponibilidade de elementos químicos como Cu, Fe e Zn (BALL, 1988). Os microrganismos, principalmente bactérias e fungos, decompõem as folhas e seus produtos como, a lignina e o tanino das árvores de mangue, formando uma cadeia trófica baseada no uso dos resíduos resultantes desta decomposição (GUIMARÃES & SILVA, 1997). Assim, o produto resultante de uma associação entre as plantas decompostas e os microrganismos é ingerido pela fauna bêntica detritívora, que serve como alimento para organismos de maior porte, formando assim uma rede alimentar nesses ecossistemas (HERNANDEZ-ANTARA & SOLIS-WEISS, 1987).

Processos importantes, como a ciclagem de nutrientes, estão diretamente relacionados com a atividade e diversidade das comunidades microbianas do solo, pois os microrganismos, principalmente as bactérias, são responsáveis pela maior parte do fluxo de nutrientes no sedimento dos manguezais, processando a maioria desses e atuando como sumidouro de carbono (HOLGUIN *et al.*, 2001). Poluentes de natureza antrópica podem causar desequilíbrios ecológicos e mudar a composição dessas comunidades, que podem ocasionar a extinção de espécies-chave para a dinâmica e a manutenção desse ecossistema, resultando na redução da ciclagem de nutrientes e do crescimento das plantas (CURY, 2002).

Segundo Lacerda & Diop (1993), 15 milhões de hectares são cobertos pelo ecossistema de manguezal no mundo. Atualmente, restam menos de 50% do território original, e destes, mais da metade encontra-se degradada, principalmente ocasionado pelas atividades de origem antrópica (DINESH *et al.*, 2004).

1.2. Poluição por petróleo em manguezais

O manguezal ao longo dos anos vem sofrendo com impactos causados pela influência antropogênica, como tráfego de navios, derrames de petróleo, esgoto urbano e descarga ilegal de produtos industriais (TAM *et al.*, 2002). Entre os impactos sofridos pelas áreas de manguezal, podem-se enfatizar os derramamentos de petróleo, que nos últimos anos vem ocorrendo com frequência, devido ao crescimento da população urbana e das atividades derivadas dos portos e indústrias, como por exemplo, o transporte de petróleo e seus derivados e os insumos químicos contaminantes produzidos pelas indústrias, que ao longo dos anos são aglomerados no meio ambiente, representando um grande risco à saúde da população mundial (HOLGUIN *et al.*, 2001; MACIEL, 2004).

O petróleo é um recurso não renovável, formado através de processos biogeoquímicos sofridos pela matéria orgânica depositada geologicamente, sendo que sua exploração comercial ocorre há mais de 140 anos. Desde o início dessa atividade, os engenheiros do petróleo têm encarado dificuldades causadas por microrganismos (ATLAS, 1981) - a existência de grandes e diversas populações de microrganismos com diferentes atividades metabólicas em sistemas de petróleo destroem os componentes dos hidrocarbonetos derivados do petróleo, tornando estes mais densos (OLIVEIRA *et al.*, 2008; VAN HAMME *et al.*, 2003).

O petróleo é uma mistura bastante complexa de hidrocarbonetos acíclicos, alicíclicos, aromáticos e, em proporções menores, de compostos não hidrocarbônicos, como os ácidos naftênicos, fenóis, tióis, porfirinas e compostos nitrogenados e sulfurados (Figura 1) (ATLAS & BARTHA, 1992). Esse poluente sofre diversas transformações físicas e biológicas que são reguladas pelas características específicas do derramamento e do ambiente atingido. Assim, os níveis da contaminação e da persistência do petróleo no ambiente dependem da interação de diversos fatores como: local atingido, tipo e quantidade do óleo, organismos atingidos, tipo do solo (características físicas, químicas e biológicas do solo), condições hidrográficas e climáticas, frequência e tempo de duração dos derrames, época do ano e os procedimentos utilizados para a descontaminação (PEREIRA, 2007).

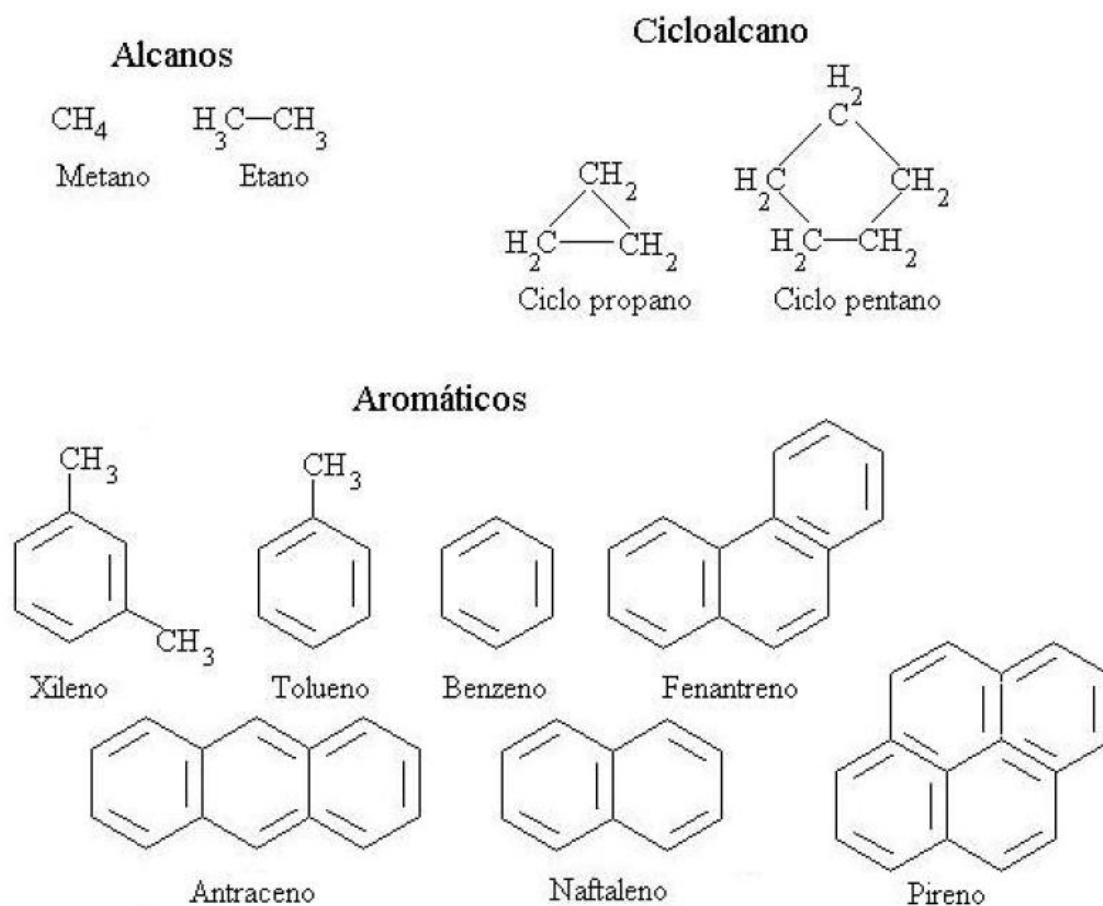


Figura1: Classificação estrutural de alguns componentes do petróleo (Fonte: Silva, 2004).

Um grupo muito importante de poluente derivado do petróleo são os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). HAPs são contaminantes onipresentes no ambiente que podem causar grande preocupação devido à sua persistência, toxicidade, e por serem altamente mutagênicos e carcinogênicos. A exposição humana aos HAPs pode ocorrer por via oral, dérmica ou por inalação. A geração destes contaminantes ocorre espontaneamente e de forma ininterrupta, pela combustão incompleta da matéria orgânica, da biomassa vegetal, da madeira e de outros materiais orgânicos. Porém, a contaminação ambiental está associada à geração antropogênica destes compostos, que ocorre através das indústrias petroquímicas, que produzem HAPs para serem aproveitados na fabricação de corantes, de fibras sintéticas, de preservantes de madeira, dentre outros (JACQUES *et al.*, 2007). Devido à baixa solubilidade e alta hidrofobicidade, esses hidrocarbonetos são agregados pela matéria orgânica, se acumulando com uma grande facilidade no sedimento (KE *et al.*, 2005).

Devido a algumas características dos manguezais, como a alta produção de matéria orgânica e condições anaeróbicas do sedimento, há uma maior facilidade desse ambiente em acumular poluentes como os hidrocarbonetos do petróleo (CURY, 2002; RAMSAY *et al.*, 2000). O grau de contaminação dos sedimentos de manguezais por petróleo e seus derivados varia de acordo com a proximidade com as atividades humanas, fontes e tipos de poluição, e as propriedades dos sedimentos, em especial, o teor de matéria orgânica e granulometria (GUO *et al.*, 2005). Segundo, Ramsay *et al.*, (2000) a taxa de biodegradabilidade de hidrocarbonetos em sedimentos de manguezais é restringida principalmente, pela baixa concentração de oxigênio, em virtude que os principais microrganismos degradadores de petróleo são aeróbicos. Outro fator limitante é a disponibilidade de nutrientes no ecossistema, principalmente nitrogênio e fósforo, que embora estejam presentes em níveis elevados nos manguezais, estão sob a forma indisponível para esses microrganismos, possibilitando que esse poluente persista por mais de 20 anos neste ecossistema.

Em manguezais, os impactos causados por hidrocarbonetos do petróleo são muito sérios, principalmente sobre os bosques de bordas e isolados que possuem uma sensibilidade maior, devido à grande quantidade de raízes que podem reter com maior facilidade o contaminante (BOTELHO, 2003). Esses danos ocorrem através da atuação da maré, onde o óleo derramado cobre as raízes das árvores impossibilitando que haja uma troca gasosa entre as plantas, causando morte e conseqüentemente a erosão da região onde ocorre uma carência de barreiras físicas que impedem que o sedimento seja carregado pela maré (KREPSKY, 2004).

Um dos mais críticos danos causados pelo petróleo é a mudança do fluxo e transferência de energia por acúmulo desse contaminante nos níveis mais altos da cadeia trófica. Essa acumulação sugere o grande potencial de movimento através da cadeia alimentar aquática (BOTELHO, 2003).

Uma grande quantidade dos elementos do petróleo são biodegradados. Entretanto, uma pequena proporção desses compostos apresenta baixa taxa de degradação, sendo recalcitrado no ambiente. Esses compostos recalcitrados, mesmo sendo em uma quantidade menor, representam ao longo dos episódios de derrames um grande impacto ao ecossistema, podendo ser bioacumulados através da cadeia trófica nos organismos. Assim, após esses episódios, o destino desses compostos no ambiente, está diretamente ligado com a interação de diversos fatores, que resultam em maior ou menor biodegradação (CRAPEZ *et al.*, 2002).

1.3. Biorremediação

Pode-se definir biorremediação como um processo que explora a diversidade e versatilidade metabólica dos microrganismos na transformação dos contaminantes químicos em produtos menos tóxicos. O principal objetivo desse tratamento é reduzir os danos causados pelos compostos recalcitrantes no ambiente, levando a condições que sejam favoráveis ao crescimento e à atividade bacteriana (CRAPEZ *et al.*, 2002). Esse processo oferece vantagens relevantes sobre outros métodos de tratamento, uma vez que os custos são reduzidos e a poluição local é mínima (CUNHA & LEITE, 2000). O benefício máximo deste processo é a mineralização do poluente, levando, em última instância, a formação de CO₂, H₂O e biomassa. Porém, para ocorrer à degradação destes compostos através de processos biológicos, é necessário a (1) existência de microrganismos com capacidade para degradar o poluente; (2) disponibilidade e acessibilidade do composto ao microrganismo degradador; e (3) condições ambientais adequadas (como temperatura e nutrientes), para que ocorra o crescimento dos microrganismos degradantes (BEWLEY, 1996). Esse processo possui algumas limitações, como produtos químicos que não são passíveis de biorremediação, destacando-se os metais pesados, os radionuclídeos e alguns compostos clorados. Os fatores que contribuem para que haja uma limitação da

biorremediação são: fontes de energia, receptores de elétrons, nutrientes, pH, temperatura e metabólitos (BOOPATHY, 2000).

Os processos de biorremediação podem ser realizados *in situ* e *ex situ*. As técnicas *in situ* compreendem (1) a biorremediação passiva, (2) a bioestimulação e (3) a bioaugmentação. Na biorremediação passiva, também conhecida como atenuação natural, a descontaminação ocorre através de processos naturais como biodegradação, volatilização, diluição e sorção (MULLIGAN & YONG, 2004). Essa estratégia é vantajosa, pois evita impactos ecológicos à ambientes, como manguezais, que são extremamente sensíveis a agressões causadas pelo poluente (DOWTY *et al.*, 2001).

Na bioestimulação, nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo) são adicionados ao solo, estimulando a atividade dos microrganismos. Através do ajuste das condições ambientais (pH, temperatura, umidade, aeração, etc.), há o favorecimento do desenvolvimento da microbiota autóctone (JACQUES *et al.*, 2007).

A bioaugmentação consiste na inoculação de microrganismos com potencial comprovado para degradar compostos de petróleo. Esse procedimento é recomendado quando ocorre uma baixa taxa de degradação do poluente devido ao número reduzido ou inexistente de microrganismos no local contaminado. Entretanto, a aplicação desse método na descontaminação de ambientes costeiros não se mostrou suficientemente eficaz, visto que há constante atuação de processos intempéricos, correntes marinhas, ventos, ondas e competições microbianas, que limitam a utilização dessa técnica (ATLAS, 1981).

Uma alternativa promissora no auxílio dos processos de biorremediação é o uso dos biossurfactantes, que consistem em produtos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras, principalmente dos degradadores de hidrocarbonetos (NITSCHKE & PASTORE, 2002). Esses possuem características vantajosas importantes como de detergência, biodegradabilidade, atividade em várias condições, emulsificação, solubilização e dispersão de fases, aceitabilidade ecológica, diversas estruturas e a capacidade de ser modificado pela biotecnologia da engenharia genética (MANIASSO, 2001; DESAI & BANAT, 1997). Uma vez que os hidrocarbonetos em geral possuem um caráter hidrofóbico, quando entram em contato com a matéria orgânica do sedimento, ocorre uma sorção destes compostos, fazendo com que estes fiquem indisponíveis para o microrganismo degradador. Assim, através das suas características como detergência, esses biossurfactantes causam a quebra de fases, disponibilizando o contaminante. Estes biossurfactantes podem ser empregados na recuperação avançada de petróleo (Microbial

Enhanced Oil Recovery-MEOR) e em outras aplicações, como na dispersão de derrames de petróleo, transporte de petróleo bruto, remediação de solos e águas e a substituição de solventes clorados utilizados na limpeza dos tubos e máquinas contaminados por petróleo.

Várias técnicas são utilizadas visando a detecção de microrganismos com potencial para produzir biossurfactantes. Entre elas, pode-se destacar o teste do colapso da gota, que constitui uma técnica rápida, prática e reproduzível (YOUSSEF *et al.*, 2004). Essa técnica consiste em uma quebra de fases, em função de que os biossurfactantes são moléculas anfipáticas, possuindo tanto grupos hidrofílicos quanto hidrofóbicos, tendendo a distribuir-se nas interfaces de diferentes fases (como água e óleo) com diferentes graus de polaridade. Assim, esses biossurfactantes através das suas propriedades de detergência e emulsificação, reduzem a tensão superficial e interfacial (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

1.4. Degradação microbiana de hidrocarbonetos

Quando um ambiente marinho é exposto por algum tipo de contaminante, a comunidade microbiana tende a ser dominada pelos organismos capazes de sobreviver e utilizar esse poluente como fonte de energia e alimento (MACNAUGHTON *et al.*, 1999). Assim, o tamanho da população de microrganismos degradadores aumenta rapidamente, com uma maior dominância daqueles que possuem plasmídeos com genes para a degradação de hidrocarbonetos (ATLAS, 1995). A dimensão da população microbiana aumenta de 1%, em ambientes não contaminados, para mais de 10%, em ambientes contaminados (ATLAS, 1981). Além da diversidade, a abundância de microrganismos em um determinado sítio pode ajudar a caracterizar o local em relação à toxicidade destes hidrocarbonetos para a microbiota, à idade do derrame e à concentração do poluente (SAADOUN *et al.*, 2008).

A degradação microbiana é basicamente composta por um processo de oxidação, onde ocorre a perda de elétrons, na presença ou não de oxigênio, necessárias para a oxidação química e biológica das substâncias, onde esses microrganismos utilizam o oxigênio dissolvido na água para transformar os compostos orgânicos em inorgânicos,

como o CO₂ e H₂O (BOTELHO, 2003). As moléculas de hidrocarbonetos passíveis de degradação podem estar na forma de cadeias aromáticas, alifáticas, longas, curtas, lineares ou ramificadas, que são transformadas para formação de compostos que serão aproveitados pelos microrganismos no metabolismo (SCHNEIDER, 2007). Dentre os hidrocarbonetos citados acima, os de cadeia alifática são considerados com grande potencial para a degradação dos microrganismos, pois possuem estruturas químicas menos complexas que podem ser mais fáceis de degradar (RAMSAY *et al.*, 2000). Uma exceção é observada com os compostos contendo até nove átomos de carbono (<C₉), pois estes evaporam com maior facilidade e comportam-se como solventes, rompendo a membrana celular dos microrganismos e reduzindo a biodegradação (SCHNEIDER, 2007).

Muitos microrganismos são capazes de degradar hidrocarbonetos do petróleo. Entre os gêneros mais conhecidos de bactérias, destacam-se *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Serratia*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, entre outros e vários gêneros de fungos como, *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Candida*, *Penicillium*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Aspergillus* e *Chrysosporium*. Alguns são degradadores de compostos alifáticos saturados, outros de aromáticos, e alguns conseguem metabolizar ambos (CURY, 2002). Até o momento, nenhum estudo identificou alguma espécie microbiana que fosse capaz de degradar sozinha todos os componentes do petróleo. Dessa forma, é necessária a existência de consórcios microbianos, onde cada grupo de microrganismos é capaz de mineralizar um determinado composto para minimizar a complexidade dos processos metabólicos envolvidos na degradação (MACIEL, 2004; CRAPEZ *et al.*, 2002).

Diferentes microrganismos utilizam distintos processos metabólicos para obter energia. Heterotróficos aeróbicos empregam a respiração para oxidar compostos orgânicos como fonte de carbono e energia. Os heterotróficos são os mais importantes para degradação de contaminantes orgânicos e podem obter energia da fermentação, respiração aeróbica e anaeróbica (ALEXANDER, 1967). Os processos aeróbicos são caracterizados pelas atividades que envolvem o oxigênio como reagente. As enzimas dioxigenases e monooxigenases são duas das principais utilizadas pelos organismos durante a transformação e mineralização dos poluentes (BOOPATHY, 2000).

Segundo Bugg & Winfield (1998), o crescimento de microrganismos provenientes de sedimento de manguezal, em condições laboratoriais como em placas com petróleo, pode ser justificado pela grande quantidade de compostos aromáticos brutos que ocorrem naturalmente nesse ecossistema, como a celulose, a lignina e o tanino que são parcialmente decompostos no sedimento. Assim, as mesmas vias enzimáticas

necessárias para a degradação destes compostos naturais, podem ser utilizadas para a degradação dos hidrocarbonetos provenientes do petróleo. Além disso, pode haver aumento na capacidade de biodegradação dos hidrocarbonetos em algumas populações de microrganismos nativas, em ambientes poluídos com óleo, processo chamado de adaptação, onde existem três mecanismos: (1) indução, (2) depressão de enzimas e alterações genéticas e (3) enriquecimento seletivo (SPAIN *et al.*, 1980).

Dessa forma, o objetivo deste estudo é isolar bactérias que utilizem petróleo como única fonte de carbono e verificar se há existência de bactérias produtoras de biossurfactantes no sedimento de um manguezal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de Estudo

O presente trabalho foi conduzido no manguezal do estuário do rio Paraíba do Sul, que possui duas saídas, uma sendo classificada como Estuário Principal, na localidade de Atafona, município de São João da Barra e outra o Estuário Secundário, ao norte da desembocadura, na região de Gargaú, município de São Francisco do Itabapoana, local do presente estudo (Figura 2). Este ecossistema está localizado ao norte da costa do Estado do Rio de Janeiro, e é considerado como um delta em forma de cúspide. Este estuário apresenta uma planície formada por uma sequência de faixas arenosas alongadas que apresentam limites, largura e extensões variáveis, intercaladas por terrenos superficialmente argilosos, onde se desenvolvem áreas de manguezal (BERNINI & REZENDE, 2004).

O manguezal do estuário do rio Paraíba do Sul é o maior da região Norte Fluminense, com aproximadamente 800 hectares (ha), sendo constituído por uma floresta de mangue com as seguintes espécies: *Avicennia germinans*, *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa* (BERNINI & REZENDE, 2004).

Em um período de 26 anos foi realizado um estudo a fim de determinar a degradação sofrida no manguezal do estuário do rio Paraíba do Sul. Foi possível constatar que nos primeiros dez anos de estudo não houve mudança na área original que era de aproximadamente 912 ha, porém nos últimos 16 anos (1986 – 2001), houve uma perda de 20% da área, restando apenas 725 ha (BERNINI *et al.*, no prelo). Essa degradação se deve principalmente ao corte de árvores e invasão da pecuária local, além de outros fatores como urbanização, obras de dragagem efetuada no canal principal e abertura de novos canais (BERNINI & REZENDE, 2004). Até o momento não se tem relatos sobre nenhuma contaminação com petróleo no local do estudo.

2.3. Análises físicas e químicas do sedimento

Foram feitas análises físicas no sedimento, considerando-se pH, salinidade e granulometria. Para a realização das análises de pH e salinidade, aproximadamente 50g do sedimento foram colocados em tubos Falcon de 50 mL e centrifugados em um centrífuga Hitachi modelo, Himac CF7D2, a uma rotação de 2800 por 15 minutos, a fim de separar a água intersticial para a realização das medições. A seguir, as análises de pH, salinidade e granulometria foram efetuadas utilizando-se um pHmêtro Digimed modelo, DM- 2P, um refratômetro de salinidade VEE GEE, modelo A366ATC e um granulometro SHIMADZU, modelo SALD - 3101 respectivamente.

Parte da amostra foi congelada e enviada em triplicata em recipientes descartáveis de alumínio para o laboratório da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, onde foram feitas análises dos hidrocarbonetos do sedimento, a fim de verificar o grau e a existência de contaminação do sedimento e quais os tipos de hidrocarbonetos encontrados.

2.4. Seleção de microrganismos com potencial de biodegradação dos compostos do petróleo

Para a seleção de microrganismos com potencial para a degradação foram considerados dois tratamentos. O primeiro tratamento foi denominado antes da incubação com petróleo (A) e o segundo foi denominado depois da incubação com petróleo (D).

2.4.1. Tratamento das amostras antes da incubação com petróleo

Em frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 90 mL de solução tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7,0, dez gramas do sedimento úmido foram inoculados e incubados à temperatura ambiente ($\pm 28^{\circ}$ C) sob agitação em um agitador orbital a 200 rpm (rotações por minuto) por 30 dias (WETLER, 2006).

Em intervalos de sete dias (0, 7, 14, 21 e 28), foram retiradas alíquotas do inóculo e diluídas serialmente (de 10^{-1} a 10^{-8}) em NaCl a 0,85% e, em seguida, foram inoculados em duplicata 100 μ L de cada diluição em placas com meio de cultura para heterotróficos totais (extrato de carne 3 – 5 g/L; peptona 10 g/L; NaCl 5 g/L; ágar bacteriológico 25 g/L), em pH 7,0 (LI *et al.*, 2000). Cada diluição foi espalhada com auxílio de uma alça de Drigalsky previamente esterilizada em álcool a 70% e ligeiramente flambada na chama do

bico de Bunsen. As diluições também foram cultivadas em meio mínimo mineral (K_2HPO_4 0,1%; KH_2PO_4 0,1%; NH_4Cl , 0,1%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05%, $CaCl_2$ 0,001%, $FeSO_4$ 0,001%) acrescido de 0,5% (V/V) de petróleo como única fonte de carbono e 1,5% de ágar bacteriológico como agente solidificante (LI *et al.*, 2000 modificado), onde em duplicata 100 μ L de cada diluição foram inoculados em tubos contendo ágar-ágar a 0,7% (a aproximadamente 40°C) e em seguida essa mistura foi inoculada nas placas contendo meio para degradadores de petróleo. As placas foram, então, incubadas a 37° C e a contagem realizada após 48 horas de incubação. Foram consideradas apenas as contagens que variaram de 30 a 300 colônias (CLARK, 1965 *apud* VIEIRA & NAHAS). Essa contagem foi comparada com os microrganismos que cresceram em meio de cultura para heterotróficos totais, obtendo-se uma estimativa da proporção de degradadores em relação ao total de microrganismos cultiváveis. Para a correção dos dados de contagem em função do peso do sedimento, foram pesadas triplicatas da amostra e secas em estufa a 40°C. Dessa forma, podem ser obtidos os pesos seco e úmido do sedimento. O sedimento de manguezal possui elevado teor de umidade, sendo indispensável à correção da unidade de volume (mL) para unidade de massa (g).

2.4.2. Tratamento das amostras depois da incubação com petróleo

Em um segundo experimento realizado imediatamente após a chegada do sedimento ao laboratório, dez gramas do sedimento fresco foram inoculados em um frasco Erlenmeyer de 250 mL com 90 mL de uma solução de meio mínimo mineral, contendo 2% de petróleo, e mantido sob agitação a 120 rpm à temperatura ambiente (\pm 28° C). Em intervalos de aproximadamente 30 dias, foi adicionado meio mínimo mineral como suprimento de nutrientes para os microrganismos, e quando o petróleo foi degradado visualmente, a mistura foi centrifugada (WETLER, 2006) e o plaqueamento foi realizado novamente com o sedimento incubado (LI *et al.*, 2000). As condições criadas em laboratório se assemelham às condições naturais de um derrame de petróleo de porte médio.

Posteriormente à contagem, os microrganismos que cresceram nas placas com petróleo em ambos os tratamentos, foram isolados em placas com ágar nutriente e a seleção de bactérias foi feita através da visualização de lâminas a fresco em um microscópio óptico, devidamente coradas com lugol. As bactérias foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio TSB (Triple Soy Broth). Após o crescimento em estufa a 37° C, 800 μ L das soluções bacterianas foram transferidas para tubos Eppendorf com

20% de glicerol e estocadas em congelador a -20° C (Figura 3).

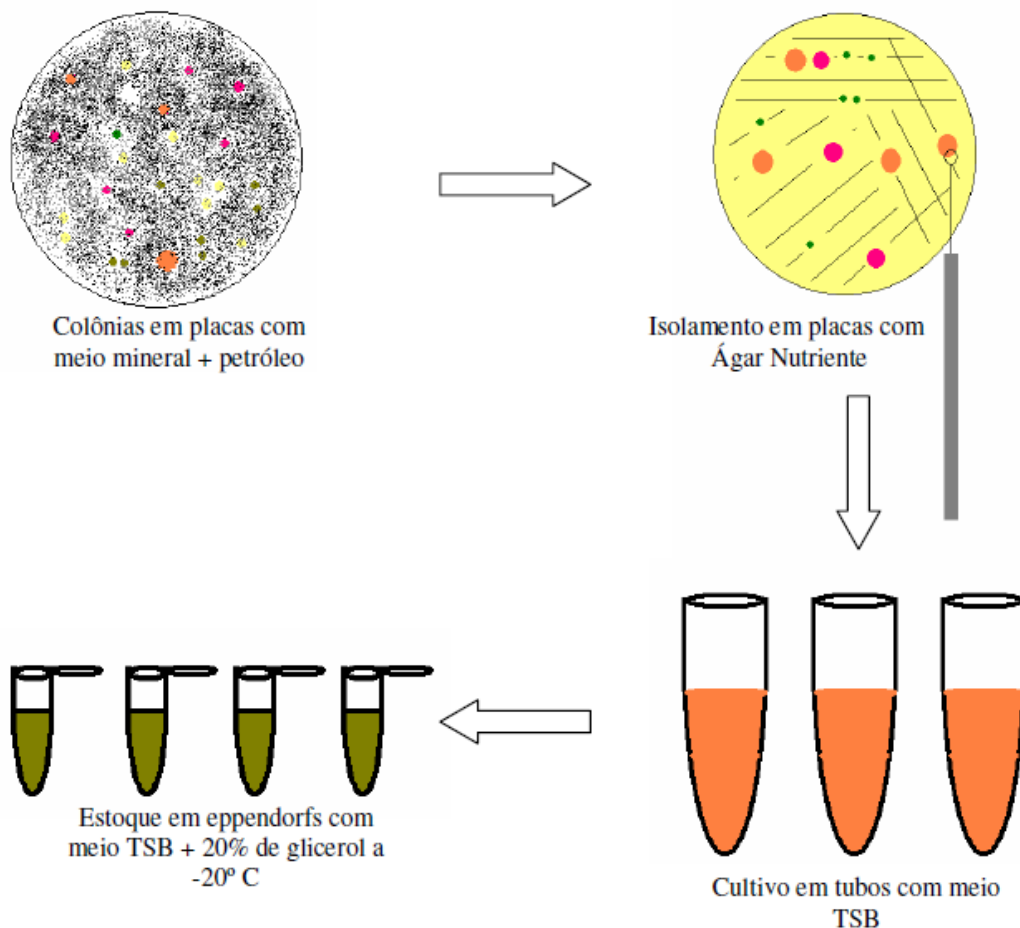


Figura 3: Esquema ilustrativo do isolamento dos microrganismos que cresceram em placas de petróleo, em placas de ágar nutritivo e posterior estoque dos mesmos (Fonte: Wetler, 2006).

2.5. Teste para avaliar a capacidade de produção de biossurfactantes

Para avaliar a habilidade de produção de biossurfactantes pelas bactérias isoladas, foram padronizados inóculos de densidade 2 com o uso do cartão de Wickerham (Figura 4), que consiste em um cartão com três linhas pretas, que servem de referência na estimativa da concentração celular em uma suspensão microbiana. A avaliação foi feita de forma comparativa em uma escala de 0 a 3, onde 0 significa poucas células com as linhas pretas totalmente visíveis; 1 significa densidade fraca, com linhas visíveis, porém pouco turvas; 2 significa densidade média, com linhas visíveis, porém turvas e difusas e, finalmente 3, que representa uma densidade forte, onde não se pode mais ser observada a presença de linhas. (TOSTA, 2004).

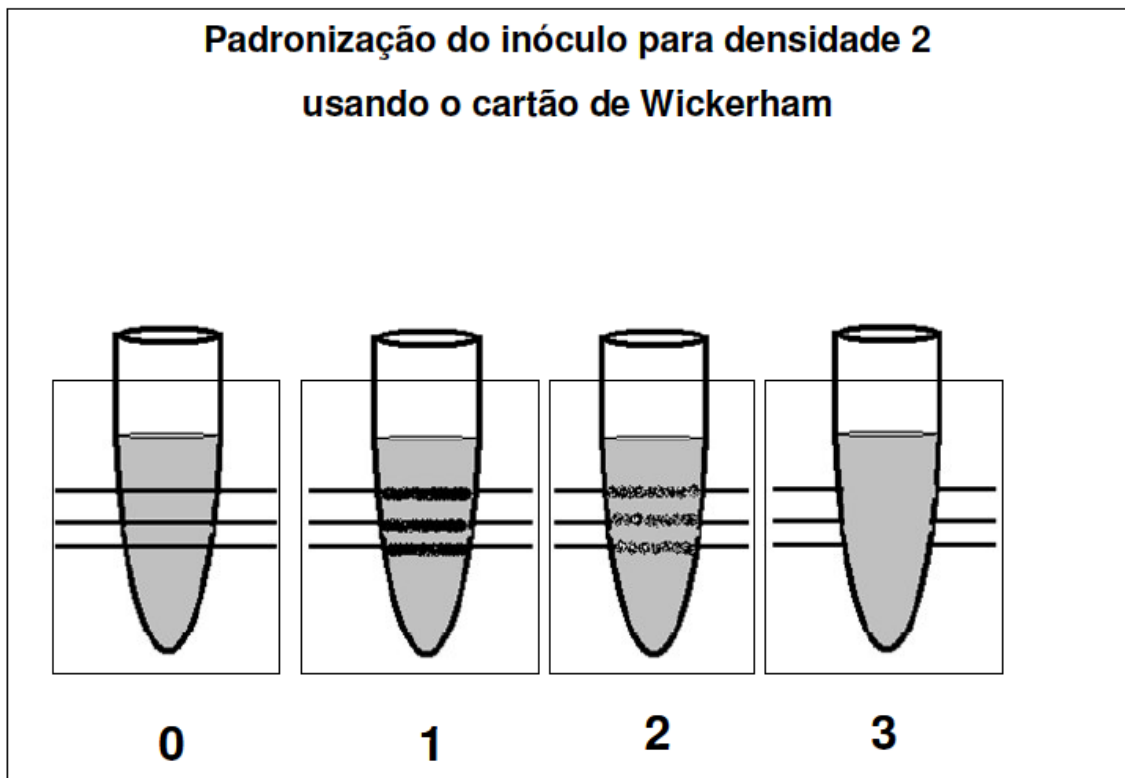


Figura 4: Esquema da padronização dos inóculos com o cartão de Wickerham (Fonte: Wetler, 2006).

Para testar a capacidade das bactérias isoladas quanto à produção de biossurfactantes, foram feitos testes de colapso da gota, uma técnica descrita por Jain *et al.*, 1991 (apud SÜLE *et al.*, 2009), onde 100 μL de cada suspensão padronizada foi inoculada separadamente em "poços" de placas de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) antecipadamente preenchidos com 50 μL de óleo mineral. Após 1 minuto de reação, o resultado foi determinado através da visualização em microscópio estereoscópio. Quando houve o colapso da gota de óleo mineral e conseqüente dissolução do óleo, o resultado foi considerado positivo (Figura 5). O controle positivo das amostras foi preparado utilizando-se SDS (dodecil sulfato de sódio) a 25% no lugar das amostras.

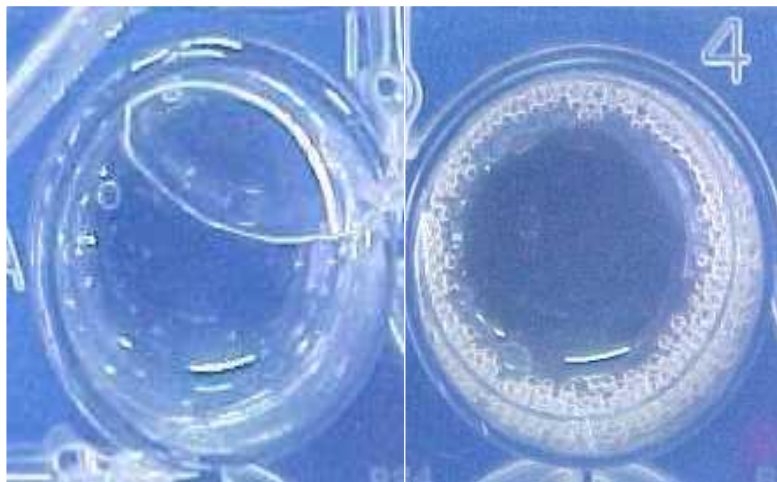


Figura 5: Colapso da gota

As bactérias que apresentaram resultado positivo para a produção de biossurfactantes serão posteriormente submetidas à PCR (Polymerase Chain Reaction) de colônia com iniciadores para a região 16S do rDNA, e sequenciadas para identificação.

2.6. Análise estatística

Para verificar a influência do meio de cultura no crescimento microbiano e para detectar diferenças nas contagens iniciais de microrganismos de acordo com o meio de cultura empregado antes e depois da incubação com petróleo foi feita uma análise de variância (ANOVA *one way*), com o teste de Duncan como pós-teste, utilizado o pacote estatístico STATISTICA 5.0 (StatSoft, 1996).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análises físicas e químicas do sedimento

As análises granulométricas demonstraram que o sedimento apresentou 12% de areia, seguido de 20% de argila e 68% de silte. Como houve uma predominância das frações finas, o sedimento foi classificado como silte argiloso.

O sedimento apresentou pH igual a 6,35 e salinidade igual a 3,0‰. Esses valores são considerados baixos, porém justificados uma vez que o local da coleta fica distante do mar. Outro fator que contribui para o baixo valor de salinidade encontrado nesse local é a grande influência de água doce do rio Paraíba do Sul, uma característica marcante desse estuário.

Na tabela 1 são apresentados os valores de referência que indicam a origem dos hidrocarbonetos. Os dados dos hidrocarbonetos no sedimento do manguezal são apresentados em triplicata na Tabela 2. De acordo com os índices apresentados, há uma dominância de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) oriundos da combustão ou de biomassa, demonstrando que não houve indicativos de hidrocarbonetos de procedência petrogênica. A degradação desses compostos nos sedimentos de manguezal ocorre principalmente na camada superficial, devido à baixa taxa de migração dos HAPs no sedimento. A comunidade microbiana que habita essa camada é crucial para degradação desses hidrocarbonetos (GOMES *et al.*, 2007), assim a superfície do sedimento é o local dominante da atividade microbiana para a mineralização do carbono nesse ecossistema (BOUILLON *et al.*, 2004). Para analisar o nível de impacto por HAPs no sedimento, foram utilizados os limites sugeridos pela NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) (BUCHMAN, 1999), no qual o índice TEL (Threshold Effect Level), indica abaixo de que concentração não é encontrado efeitos adversos, onde esse valor não pode exceder 1.684 ng g^{-1} para o somatório de HAPs. Neste estudo, os valores obtidos de HAPs estão abaixo do limite sugerido, indicando que não há níveis de toxicidade nas amostras coletadas.

Tabela 1. Razões diagnósticas calculadas e seus limites referentes à origem dos hidrocarbonetos.

Razões Diagnósticas	Petróleo	Combustão	Combustão de petróleo	Combustão de biomassa	Mistura de Fontes
FI/FI+Py	< 0,4		0,4 – 0,5	> 0,5	
FI+Py/ (FI+Py+C1Py)	< 0,5	> 0,5			
Ph+A/ (Ph+A+C1Ph)		> 0,5			< 0,5
A/A+Ph	< 0,1	> 0,1			
BaA/ BaA+Ch	< 0,2	> 0,35			0,2 – 0,35
IP/ IP+BghiPe	< 0,2		0,2 – 0,5	> 0,5	
S3-6anéis/ S séries alquil	< 0,05		> 0,8		0,05 – 0,8

Legenda – Onde: FI = fluoranteno; Py = Pireno; C1Py = C1 pirenos; Ph = Fenantreno; C1Ph = C1 fenantrenos; A= Antraceno; BaA = Benzo(a)antraceno; Ch = Criseno; IP = Indeno(1,2,3-cd)pireno; BghiPe = Benzo(ghi)perileno.

Tabela 2. Resultado das Razões diagnósticas calculadas nas amostras em triplicata.

Razões Diagnósticas	Rio 1	Rio 2	Rio 3
FI/FI+Py	0,59	0,58	0,58
FI+Py/ (FI+Py+C1Py)	0,84	0,84	0,86
Ph+A/ (Ph+A+C1Ph)	0,65	0,73	0,73
A/A+Ph	0,42	0,51	0,41
BaA/ BaA+Ch	0,52	0,51	0,53
IP/ IP+BghiPe	0,51	0,5	0,51
S3-6anéis/ S séries alquil	1,64	1,93	2,02

3.2. Contagem de microrganismos em placas com meio para heterotróficos totais (HT)

Apesar das limitações na utilização da contagem do número de bactérias heterotróficas em meio de cultura, esse método pode trazer informações adicionais quando utilizado para fins de comparação (BAUDOIN *et al.*, 2001). Neste estudo, foi possível observar que a contagem em placas com meio de HT variou entre 10^9 a 10^{11} UFC.g⁻¹ (Unidades Formadoras de Colônia por grama de sedimento) para a amostra antes da incubação com petróleo (HT A). Após a incubação (HT D), a contagem passou para 10^8 a 10^{10} UFC.g⁻¹ de sedimento (Figura 6).

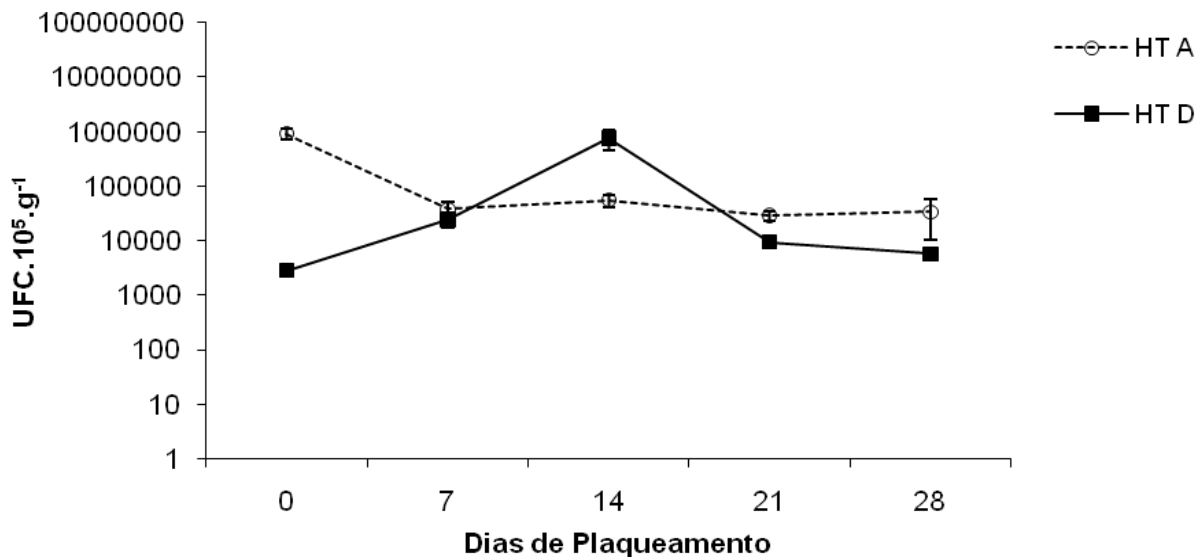


Figura 6: Médias e respectivos desvios-padrão das contagens em placas de heterotróficos totais antes e depois da incubação da amostra de sedimento com petróleo. HT A= Placas de heterotróficos totais antes da incubação com petróleo; HT D= Placas de heterotróficos totais depois da incubação com petróleo;

A contagem do dia 0 antes da incubação indica o número de microrganismos cultiváveis da amostra original. É possível perceber que em condições de laboratório, houve uma diminuição inicial da contagem (dia 7), e estabilização da comunidade ao longo do período do experimento.

Foi possível constatar que entre os tratamentos houve uma diferença nas contagens do dia 0 em presença e ausência do petróleo, demonstrando que o poluente foi um agente selecionador, diminuindo a contagem microbiana. Entre os dias 0 e 14, houve um aumento na contagem de HT na amostra exposta ao petróleo e a partir do dia 14 uma diminuição, indicando que a comunidade microbiana presente é capaz de se adaptar a presença do petróleo, aumentando em número para ocupar os nichos disponíveis. No entanto, a partir do dia 14, quando provavelmente a comunidade atingiu a capacidade suporte, foi notada uma diminuição na contagem.

Segundo, Santos (2004) a entrada de um contaminante no ambiente pode resultar em um aumento seletivo ou uma redução no tamanho da população de microrganismos. Dessa forma, pode ocorrer um aumento daquelas populações com microrganismos capazes de se adaptarem as condições do ecossistema e uma diminuição daquelas que são mais sensíveis ao poluente.

Os valores apresentados neste trabalho foram superiores aos encontrados por Ramsay *et al.* (2000), onde a contagem em placas de HT manteve-se constante durante o período de estudo, variando de 10^5 a 10^6 UFC.g⁻¹ de sedimento de manguezal não

contaminado. Para tal, os autores utilizaram uma adaptação do método do número mais provável, com os meios Marine Broth 2216 e Bushnell Haas em placas de ELISA e a contagem de bactérias heterotróficas e degradadoras foi efetuada por um programa de computador. A metodologia utilizada por esses autores (2000), difere da empregada no presente estudo, que possui o objetivo de obter isolados, portanto, foram utilizados meios sólidos para se fazer a contagem e, posterior isolamento das colônias.

No mesmo estudo (RAMSAY *et al.*, 2000), com uso da técnica de aeração, a contagem de heterotróficos em sedimento contaminado com óleo bruto teve um aumento de 100 vezes (10^8 UFC.g⁻¹), demonstrando que o oxigênio era um fator limitante ao crescimento dos microrganismos. Após 120 dias, com o término da aeração, a contagem diminuiu de 10^8 para 10^7 UFC.g⁻¹, causada pela limitação do oxigênio. Em um procedimento similar, no presente estudo, o sedimento incubado foi mantido sob agitação durante todo o período do experimento, fazendo com que oxigênio ficasse disponível para os microrganismos, atuando como um fator favorável a biodegradação. Cury (2002), também observou um padrão encontrado por Ramsay *et al.* (2000), onde em uma exposição com petróleo houve um aumento na contagem de HT. Em contraste, Wetler (2006), observou que não houve aumento da contagem de HT na presença de petróleo no sedimento de um manguezal do sul da Bahia, em concordância com os resultados encontrados nesse estudo.

Sobre o efeito da bioestimulação e bioaugmentação na dinâmica da comunidade bacteriana do solo da Antártica, Vázquez *et al.* (2009) encontraram resultados menores do que os encontrados no presente estudo. Essa diferença pode ser explicada, devido às condições estressantes no local do estudo, como baixas temperaturas que afetam a atividade metabólica, o consumo de substrato pelos microrganismos e, por consequência, a biodegradação dos hidrocarbonetos (JACQUES *et al.*, 2007). O local analisado, já apresentava uma concentração inicial de hidrocarbonetos, obtendo uma contagem de HT de $9,6 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ e de degradadores de hidrocarbonetos de $8,2 \times 10^4$ UFC.g⁻¹.

Após a incubação do sedimento com petróleo, houve uma discreta diminuição na contagem de HT, que corrobora os resultados encontrados por Vázquez *et al.* (2009), onde nas parcelas bioestimuladas e bioaugmentadas a contagem de HT diminuiu durante o experimento de $2,3 \times 10^9$ UFC.g⁻¹ para $1,4 \times 10^9$ UFC.g⁻¹ e $8,9 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ respectivamente.

3.3. Contagem de microrganismos em placas com meio para degradadores de petróleo

Nas placas contendo petróleo, obteve-se uma contagem que variou entre 10^7 a 10^9 UFC.g⁻¹ de sedimento para a amostra antes da incubação com petróleo (PA) e, após a incubação (PD), a contagem passou para 10^7 a 10^{10} UFC.g⁻¹ de sedimento (Figura 7).

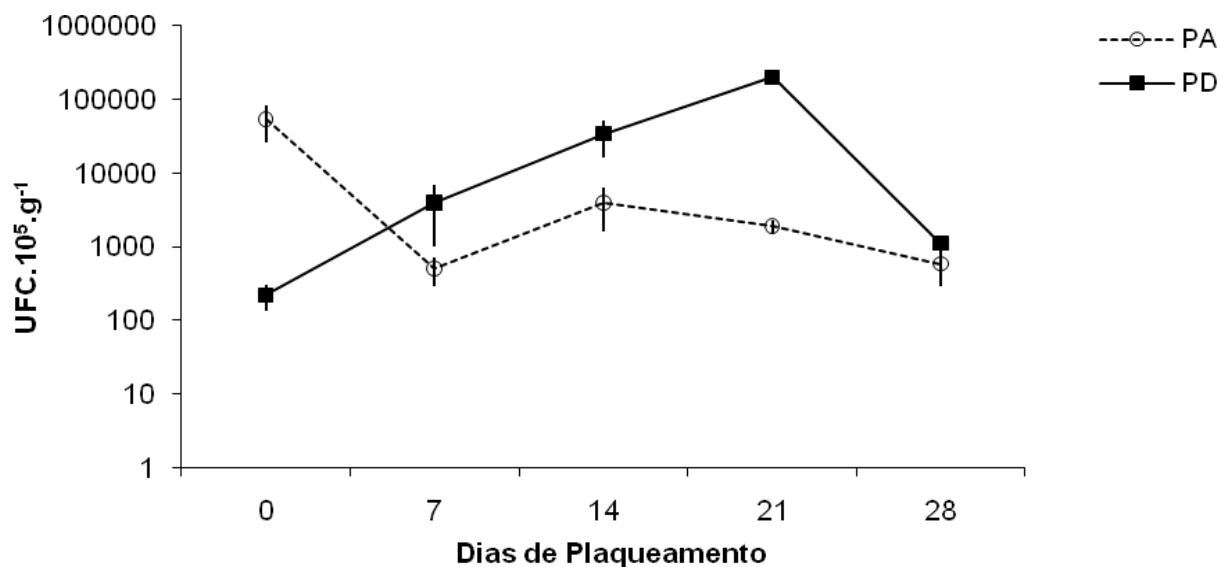


Figura 7: Médias e respectivos desvios-padrão das contagens em placas de petróleo antes e depois da incubação da amostra de sedimento com petróleo. PA= Placas contendo petróleo antes da incubação com o mesmo; PD= Placas contendo petróleo depois da incubação com o mesmo.

Como foi observado na contagem de microrganismos em placas com meio para HT, também foi possível constatar que entre os tratamentos houve uma diferença nas contagens de microrganismos degradadores do dia 0 em presença e ausência do petróleo, demonstrando que o poluente foi um agente selecionador, diminuindo a contagem microbiana.

Pode ser observado na contagem antes da incubação com petróleo que no dia zero houve uma quantidade inicial muito alta de microrganismos, que diminuiu no dia 7 e se manteve em declínio ao longo do período do experimento, indicando que as fontes de carbono que haviam no sedimento foram sendo esgotadas a partir da primeira semana.

Observa-se, um aumento significativo ($p= 0,038$) da contagem de microrganismos nas placas com petróleo após a exposição do sedimento a este poluente, principalmente no dia 21, indicando que a presença do petróleo causou modificações na estrutura da

comunidade. Assim, as espécies observadas após a incubação do sedimento com o petróleo, provavelmente representam a comunidade de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, que aumentou em número para ocupar os nichos disponíveis após a diminuição dos microrganismos que não foram capazes de utilizar o petróleo como fonte de carbono. As contagens obtidas no presente trabalho indicam o potencial das bactérias do sedimento de manguezal para a degradação de compostos do petróleo. A partir do dia 28 pode ser observada uma diminuição na contagem de degradadores, indicando que esses microrganismos entraram na fase de morte.

Ramsay *et al.* (2000), obtiveram uma contagem relativamente constante de degradadores em parcelas controle, mantendo-se em 10^3 UFC. g^{-1} de sedimento. No entanto, assim como ocorreu no presente estudo, estes autores detectaram que o número de degradadores em parcelas com óleo e biorremediadas aumentou de 10^3 para 10^4 a 10^6 UFC. g^{-1} de sedimento, ao longo de um período de 120 dias.

Estudos têm apontado que em um eventual derrame de hidrocarbonetos, os consórcios microbianos, respondem à elevada oferta de carbono com um crescimento exponencial, ocorrendo uma vantagem seletiva para as cepas que possuem plasmídeos que codificam enzimas para a degradação, resultando em um aumento desses plasmídeos na comunidade, sendo os hidrocarbonetos mais suscetíveis degradados (ATLAS *et al.*, 1991; LEAHY & COLWELL, 1990).

Já que o sedimento do manguezal estudado, não possui poluição de origem petrogênica, o valor de UFCs para os microrganismos degradadores de petróleo encontrado é considerado alto. Esse elevado valor encontrado é típico de ambientes impactados com petróleo (MACIEL, 2004), como é o caso dos *landfarms*, que são instalações feitas para estimular a degradação de compostos do petróleo por microrganismos do solo.

3.4. Influência do meio de cultura no crescimento e na contagem dos microrganismos cultiváveis

Foi realizada uma ANOVA para verificar a influência do meio de cultura no crescimento microbiano antes e depois da incubação com o petróleo (Figura 8).

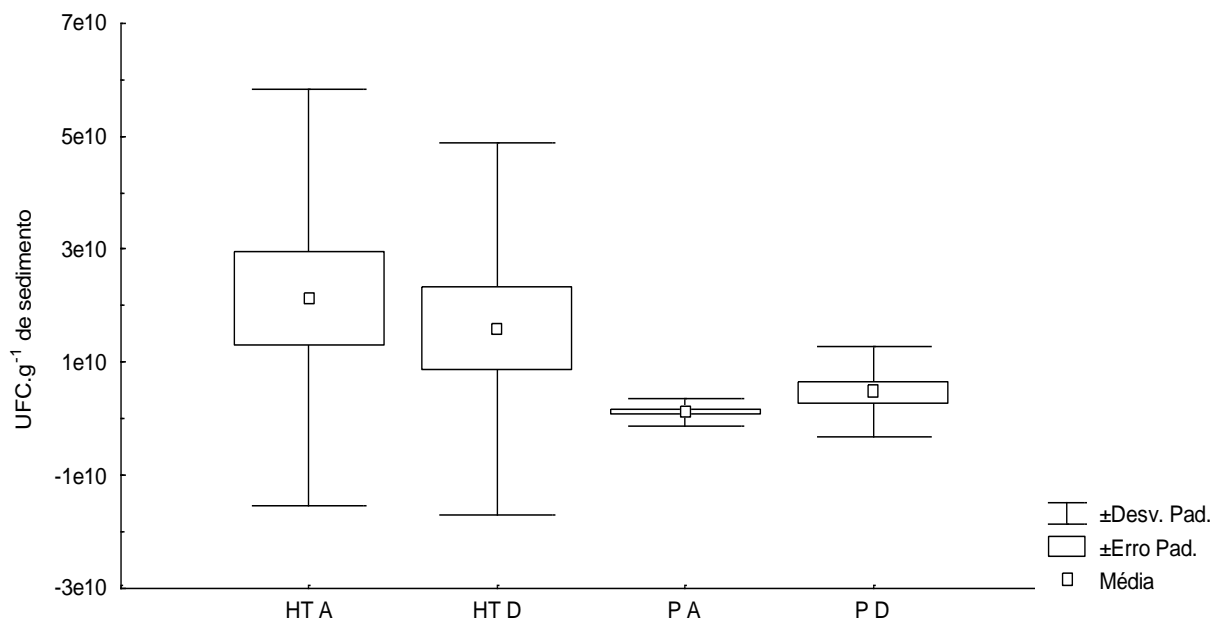


Figura 8: Box plot demonstrando o resultado da ANOVA realizada para as contagens de microrganismos da amostra coletada, cultivadas em meio HT e em meio seletivo para degradadores de petróleo. HT A: Placas de heterotróficos antes da incubação com petróleo; HT D: Placas de heterotróficos depois da incubação com petróleo; P A: Placas contendo petróleo antes da incubação com o mesmo; P D: Placas contendo petróleo depois da incubação com o mesmo

É possível observar que os resultados do teste demonstraram diferença significativa entre as amostras ($p=0,043$). De acordo com o teste de Duncan, os microrganismos da amostra apresentaram diferença ($p= 0,02$), no crescimento em meio para heterotróficos totais (HT A) e em meio com petróleo (P A). Este fato não ocorreu depois que a amostra foi incubada com o poluente (HT D e P D), indicando que o contato com o petróleo alterou a contagem de microrganismos nos meios de cultura.

Para detectar diferenças nas contagens iniciais de microrganismos de acordo com o meio de cultura empregado e após a incubação com petróleo, efetuou-se uma ANOVA, que ratificou diferença significativa entre as contagens do dia 0 de plaqueamento com $p=0,000$ (Figura 9).

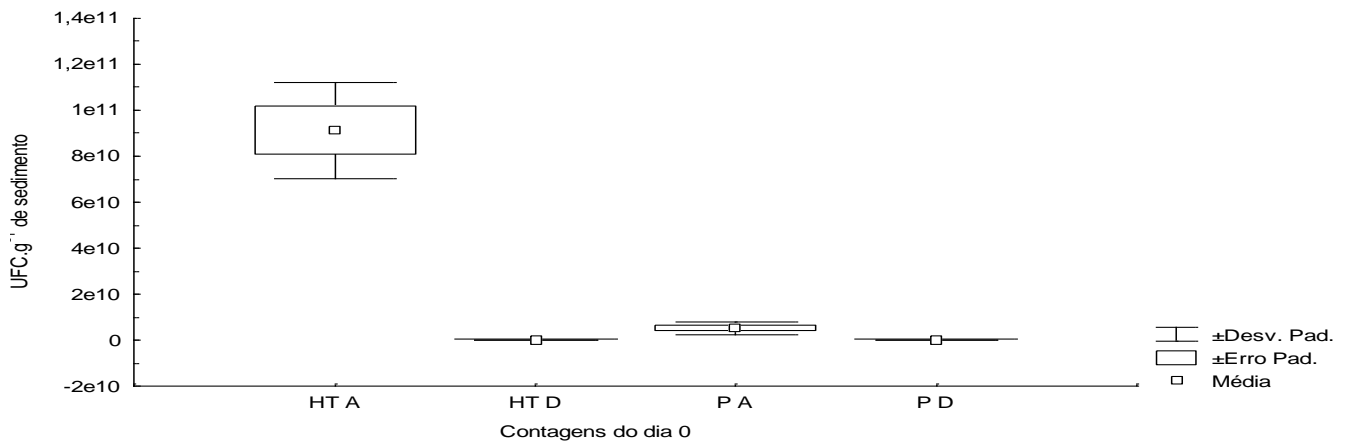


Figura 9: Box plot demonstrando o resultado da ANOVA realizada para as contagens de microrganismos no dia 0 para a amostra coletada, cultivadas em meio HT e em meio seletivo para degradadores de petróleo. HT A: Placas de heterotróficos antes da incubação com petróleo; HT D: Placas de heterotróficos depois da incubação com petróleo; P A: Placas contendo petróleo antes da incubação com o mesmo; P D: Placas contendo petróleo depois da incubação com o mesmo.

O teste de Duncan demonstrou que a contagem inicial de HT foi estatisticamente diferente ($p= 0,00$), da contagem após a incubação com petróleo (HT A e HT D), demonstrando a seletividade da incubação com petróleo. Este evento não ocorreu para as contagens em placas com meio seletivo para degradadores de petróleo (P A e P D), indicando que o número de degradadores não se modificou ao longo do experimento. Entretanto, houve diferença entre as contagens de acordo com o meio de cultura utilizado antes da incubação da amostra com petróleo (HT A e P A). Estes resultados demonstram a seletividade do petróleo sobre a comunidade de microrganismos do sedimento. Esse padrão não foi observado para as contagens em placas com o meio cultura depois da incubação com petróleo (HT D e P D), isso demonstra que, a incubação com petróleo diminuiu a contagem de HT, igualando-se ao número de degradadores de petróleo, permanecendo somente a comunidade degradadora.

De acordo com Zhou *et al.* (2009), cujo estudo mostrou pela primeira vez as alterações da estrutura da comunidade microbiana no sedimento de manguezal, tanto a concentração, tanto o tempo de exposição aos HPAs causam uma redução da diversidade microbiana, sugerindo que essa comunidade foi afetada pela contaminação. De acordo com esses autores, (2009) dois efeitos diferentes dos poluentes orgânicos sobre a diversidade microbiana foram observados. Por um lado, poluentes orgânicos podem ser utilizados como uma fonte de carbono, aumentando assim a diversidade microbiana. Por outro, em um efeito antagônico, eles representam uma ameaça tóxica para microrganismos e, como consequência, reduzem a diversidade.

3.5. Teste de colapso de gota para averiguar a capacidade dos isolados em produzir biossurfactantes

As bactérias capazes de utilizar o petróleo como única fonte de carbono foram submetidas ao teste do colapso da gota para averiguar a capacidade das mesmas em produzir biossurfactantes. Das 94 colônias bacterianas isoladas no presente estudo, 78 apresentaram capacidade de produzir biossurfactantes (aproximadamente 83%). De acordo com Bodour *et al.* (2003), alguns estudos de análise filogenética demonstram que a grande diversidade existente entre os microrganismos produtores de biossurfactantes, sugere que a produção desses metabólitos seja uma importante ferramenta para a sobrevivência desses microrganismos. Para que ocorra uma alta produção desses metabólitos pelos microrganismos, é necessário que haja um conjunto de características que, dependem principalmente dos fatores nutricionais e do ambiente.

De acordo com Krepsky *et al.* (2007), muitos estudos vêm demonstrando que os substratos de hidrocarbonetos são preferíveis para produção de biossurfactante. Bushnell & Haas (1941), foram os primeiros a demonstrar a capacidade de produção de biossurfactantes pelas bactérias, isolando *Corynebacterium simplex* e linhagens de *Pseudomonas* em um meio mineral, contendo o querosene, o óleo mineral ou a parafina como fonte de carbono.

De acordo com as análises químicas feitas no presente estudo, foram encontrados hidrocarbonetos de origem de combustão ou biomassa, com uma dominância de HAPs. De acordo com Harayama (1997), apenas um número limitado de microrganismos é capaz de degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos com quatro ou mais anéis aromáticos. Além disso, a biodegradação desses compostos é limitada pela sua baixa

disponibilidade, devido a sua elevada hidrofobicidade (KE, *et al.*, 2005). Segundo Ganeshlingam *et al.* (1994), a aplicação de surfactantes como agentes de solubilização pode ser uma maneira de aumentar a disponibilidade de HAP aos microrganismos. Assim, os microrganismos isolados no presente estudo, provavelmente foram aptos a degradar o petróleo e produzir biosurfactantes devido à presença de outros hidrocarbonetos no sedimento.

4. CONCLUSÕES

- O petróleo atua como um agente selecionador sobre os microrganismos, como foi visto no experimento de contagem microbiana.
- O sedimento do manguezal estudado tem uma grande quantidade de microrganismos capazes de utilizar petróleo com única fonte de carbono, uma vez que esse poluente é um composto orgânico, esses microrganismos utilizam vias enzimáticas destinadas a outros compostos para degradar esse contaminante, demonstrando grande potencial de biodegradação.
- Foi possível detectar que uma grande parte das bactérias isoladas neste estudo foi capaz de produzir biossurfactantes, demonstrando sua aplicabilidade em processos biotecnológicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATLAS, R.M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiol. Rev.** v.39, p. 180-209, 1981.

ATLAS, R. M; HOROWITZ, A.; KRICHEVSKY, M.; BEJ, A. K. Response of microbial population to environmental disturbance. **Microbial Ecol**, v 22, p.249-256, 1991.

ATLAS, R.M. Petroleum degradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v 31, p. 178-192, 1995.

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

BALL, M. C. Ecophysiology of mangroves. **Trees Structure and Function**, v 2, p. 129-142, 1988.

BAUDOIN, E.; BENIZRI, E.; GUCKERT, A.; Metabolic fingerprint of microbial communities from distinct maize rhizosphere compartments. **European Journal of Soil Biology**, v 37, p 85-93, 2001.

BENFIELD, S. L.; GUZMAN, H. M.; MAIR, J. M. Temporal mangrove dynamics in relation to coastal development in Pacific Panama. **Journal of Environmental Management**, v. 76, n. 3, p. 263–276, 2005.

BERNINI, E; REZENDE, C. E. Estrutura da vegetação em florestas de mangue do estuário do rio Paraíba do Sul, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta bot. bras.**, v. 18, n.3, p. 491-502, 2004.

BERNINI, E.; FERREIRA, R.; SILVA, F. L. C. ; MAZUREC, A. P.; NASCIMENTO, M. T. & REZENDE, C. E. Alterações na cobertura vegetal do manguezal do estuário do rio paraíba do sul no período de 1976 a 2001. **Gerenciamento Costeiro Integrado**, no prelo.

BEWLEY, R. J. F. Field implementation of in situ bioremediation: Key physicochemical and biological factors: In STOTZKY, G.; BOLLAG, T. M. **Soil Biochemistry**. New York: Marcel Dekker, v. 9, p 473-542, 1996.

BODOUR, A. A.; DREES, K. P.; MAIER, R. M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3280–3287, 2003.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v. 74 p.63-67, 2000.

BOTELHO, A. L. M. Análise da contaminação por óleo na APA de Guapimirim- RJ- aspectos geoquímicos e socioambientais. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal Fluminense. Niterói, RJ. 101p, 2003.

BOUILLON, S.; MOENS, T.; KOEDAM, N.; DAHDUOH-GUEBAS, F.; BAEYENS, W.; DEHAIRS, F. Variability in the origin of carbon substrates for bacterial communities in mangrove sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 49, p. 171–179, 2004.

BUCHMAN, M.F. *NOAA Screening Quick Reference*. Coastal Protection and Restoration Division, **National Oceanic and Atmospheric Administration**, Seattle. 12 pp, 1999.

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

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

BUSHNELL, I.D.; HASS, H.E. Utilization of certain hydrocarbon by microorganisms. **J. Bacteriol.**, v. 41, p. 653-658, 1941.

CLARK, F.E. Agar-plate method for total microbial count. In: BLACK, C.A.; EVANS, D.D.; ENSMINGER, L.E.; WHITE, J.L.; CLARK, F.E. **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, v.2, p.1460-1466, 1965.

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

CUNHA, C. D.; LEITE, S. G. F. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. **Braz.J. of Microb.**, v.31, p. 45-49, 2000.

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

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

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

DOWTY, R.A., SHAFFER, G.P., HESTER, M.W., CHILDERS, G.W., CAMPO, F.M., GREENE, M.C. Phytoremediation of small-scale oil spills in fresh marsh environments: a mesocosm simulation. **Marine Environmental Research**, v. 52, p.195–211, 2001.

GANESHALINGAM, S.; LEGGE, R.L.; ANDERSON, W.A. Surfactant enhanced leaching of polyaromatic hydrocarbons from soil. **Trans Inst Chem Eng.**, v. 72, p. 247-251, 1994.

GOMES, N. C. M.; BORGES, L. R.; PARANHOS, R.; PINTO, F. N. KRÖGERRECKLENFORT, K.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S.; SMALLA, K. Diversity of *ndo* genes in mangrove sediments exposed to different sources of polycyclic aromatic hydrocarbon pollution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7392–7399, 2007.

GUO C. L.; ZHOU H. W.; WONG Y. S.; TAM N. F. Y. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. **Marine Pollut. Bull.**, v.51, p. 1054–1061, 2005.

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

HARAYAMA, S. Polycyclic aromatic hydrocarbons bioremediation design. **Curr Opin Biotechnol**, v. 8, p. 268-273, 1997.

HEGAZY, A.K. Perspectives on survival, phenology, litter fall and decomposition and caloric content of *Avicennia marina* in the Arabian Gulf region. **Journal of Arid Environments**, v. 40, p. 417-429, 1998.

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

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biol Fertil Soils**, v. 33, p.265–278, 2001.

JACQUES, R. J. S. *et al.* Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Cienc. Rural, Santa Maria**, v. 37, n. 4, Aug. 2007.

JAIN, D.K.; COLLINS-THOMPSON, D.L.; LEE, H.; TREVORS, J.T. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. **J Microbiol Methods**, v.13, p.271–279, 1991.

KE, L.; YU, K.S.H.; WONG, Y.S.; TAM, N.F.Y. Spatial and vertical distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments. **Science of the Total Environment** v.340, p.177– 187, 2005.

KREPSKY, N. Produção de biossurfactantes por consórcios bacterianos hidrocarbonoclasticos. **Dissertação de Mestrado** em Biologia Marinha, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 2004.

KREPSKY, N.; DA SILVA, F.S.; FONTANA, L.F.; CRAPEZ, M.A.C. Alternative methodology for isolation of biosurfactant-producing bacteria. **Braz. J. Biol.**, v.67, n. 1, p. 117-124, 2007.

LACERDA, L.D.; REZENDE, C.E.; JOSÉ, D.V.; WASSERMAN, J.C. & FRANCISCO, M.C.. Mineral concentration in leaves of mangrove trees. **Biotropica**, v. 17, p. 260-262, 1985.

LACERDA, L.D. & DIOP. Conservation and Sustainable Utilization of Mangrove Forests in Latin America and Africa Regions. **International Society for Mangrove Ecosystems**, 1993.

- LEAHY, J. G. & COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiol. Mol. Bio.l Rev.**, v. 54, n. 3, p. 305-315, 1990.
- LI, G.; HUANG, W.; LERNER, D. N. & ZHANG, X. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. **Wat . Res.**, v. 34, p. 3845-3853, 2000.
- LIZÁRRAGA, J.A.A., VERDUGO, F.J.F., RUBIO, A.O. Structure and litterfall of an arid mangrove stand on the Gulf of California, Mexico. **Aquatic Botany**, 79:137-143, 2004.
- MACIEL, B. M. Estudos prospectivos de microrganismos de solo de *landfarm* com potenciais aplicações em estratégias de biorremediação de áreas contaminadas por petróleo. **Dissertação de Mestrado** em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - BA, 2004.
- MACNAUGHTON, S. J.; STEPHEN, J. R.; VENOSA, A.D.; DAVIS, G. A.; CHANG, Y.J.; WHITE, D. C. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3566–3574, 1999.
- MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Quim. Nova**, v. 24, nº 1, p. 87-93, 2001.
- MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N. Natural attenuation of contaminated soil. **Environmental International**, Oxford, v.30, n.4, p.587-601, 2004.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Quim. Nova**, v. 25, nº 5, p. 772 – 776, 2002.
- OCHIENG, C.A. & ERFTEMEIJER, P.L.A. Phenology, litterfall and nutrient resorption in *Avicenia marina* (Forssk.) Virth in Gazi Bay, Kenya. **Trees**, v.16, p.167-171, 2002.
- OLIVEIRA, V. de M.; SETTE, L. D.; SIMIONI, K. C. M.; NETO, E. V. dos S. Bacterial diversity characterization in petroleum samples from brazilian reservoirs. **Brazilian Journal of Microbiology**, .39 p.445-452, 2008.
- PEREIRA, M. S. Estudos *in silico* da proteína AlkB e prospecção de bactérias alcanotróficas em solos da Bacia petrolífera Pontiguar. **Dissertação de mestrado** em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal- RN, p60, 2007.
- RAMSAY, M. A.; SWANNELL, R. P. J.; SHIPTON, W. A.; DUKE, N.C.; HILL, R. T. Effect of biorremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 41, n. 7-12, p. 413-419, 2000.
- SANTOS, A. C. F. Utilização do tolueno como única fonte de carbono por microrganismos Isolados de um *Landfarming*. **Monografia de Graduação**, Universidade Estadual de Santa Cruz, BA., 2004.
- SAADOUN, I.; MOHAMMAD, M. J.; HAMEED, K. M.; SHAWAQFAH, M. Microbial Populations of Crude Oil Spill Polluted Soils at the Jordan-Iraq Desert (the Badia Region). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p.453-456, 2008.

SCHAEFFER-NOVELI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; SOARES, M.L.G.; DE-ROSA, T. Brazilian Mangroves. **Aquatic Ecosystem Health**, v.3, p. 561-570, 2000.

SCHNEIDER A. T. Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras de gasolina comercial. **Dissertação de mestrado** em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre- RS, p 95, 2007.

SILVA, F. Q. M. Produção de biossurfactante por bactérias isoladas de sedimento de mangue (APA de Guapimirim, RJ). **Monografia de Graduação**, Universidade Federal Fluminense, Niterói- RJ, 2004.

SPAIN, J.C.; PRITCHARD, P.H.; BOURQUIN, A.W. Effects of Adaptation on Degradation Rates in Sediment/Water Cores from Estuarine and Freshwater Environments. **Applied. & Environmental Microbiology**, v.40, p. 726 – 734, 1980.

Statsoft Inc. 1996. STATISTICA for Windows (Computer program manual). **Statsoft Inc., Oklahoma.**

SÜLE, S.; CURSINO, L.; ZHENG, D.; HOCH, H.C.; BURR, T.J. Surface motility and associated surfactant production in *Agrobacterium vitis*. **Letters in Applied Microbiology**, 2009.

TAM, N.F.Y.; KE, L.; WANG, X. H.; WONG, Y. S. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of mangrove swamps. **Environ Pollut**; v. 63 p. 114-255, 2001.

TAM, N.F.Y.; GUO, C.L.; YAU, W.Y.; WONG, Y.S. Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong Kong. **Marine Pollution Bulletin** 45, 316–324, 2002.

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

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiol. Mol Biol Ver.** v.67, p.503 549, 2003.

VÁZQUEZ, S.; NOGALES, B.; RUBERTO, L.; HEMÁMDEZ, E.; CHRISTIE-OLEZA, J.; LO BALDO, A.; BOSCH, R.; LALUCAT, J.; MAC CORMACK, W. Bacterial community dynamics during bioremediation of dDiesel oil- contaminated antarctic soil. **Microb Ecol.** v. 57, p.598–610, 2009.

VIEIRA, F. C. S.; NAHAS, E. Quantificação de bactérias totais e esporuladas no solo. **Sci. agric.**, Piracicaba, v. 57, n. 3, 2000 .

WETLER, R. M. C. Prospecção de microrganismos responsáveis pela degradação de compostos de petróleo no sedimento de um manguezal localizado no sul da Bahia (Brasil). **Dissertação de mestrado** em Sistemas Aquáticos Tropicais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus – BA, 2006.

YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; KNAPP, R. M.; MCINERNEY, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n° 3, pp. 339 -347, 2004.

ZHOU, H. W.; Wong, A. H. Y.; YU, R. M. K.; PARK, Y. S.; TAM, N.F.Y. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced Structural Shift of Bacterial Communities in Mangrove Sediment. **Microb Ecol**, v. 58, p. 153–160, 2009.

<http://www.mar.mil.br/dhn/chm/tabuas/index.htm>