



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ- REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

LIZETH MERCEDES MOLINA HERRERA

**PROSPECÇÃO DE ATIVIDADE BIOSURFACTANTE E BIOEMULSIFICANTE DE
BACTÉRIAS DE SOLO DE MANGUEZAL E SEUS METABOLITOS**

**PARNAÍBA
2020**

LIZETH MERCEDES MOLINA HERRERA

**PROSPECÇÃO DE ATIVIDADE BIOSURFACTANTE E BIOEMULSIFICANTE DE
BACTÉRIAS DE SOLO DE MANGUEZAL E SEUS METABOLITOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Linha de Pesquisa: Química e Bioquímica aplicada a Biotecnologia

Orientadora: Dra. Leiz Maria Costa Veras

Coorientadora: Dra. Rosa Helena Rebouças

PARNAÍBA

ANO 2020

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

H565p Herrera, Lizeth Mercedes Molina
Prospecção de atividade biossurfactante e bioemulsificante de bactérias de solo de manguezal e seus metabolitos [recurso eletrônico] / Lizeth Mercedes Molina Herrera. – 2020.
1 Arquivo em PDF

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, 2020.
Orientação: Dra. Leiz Maria Costa Veras.
Coorientação: Dra. Rosa Helena Rebouças.
Linha de Pesquisa: Química e Bioquímica aplicada a Biotecnologia.

1. Microrganismos. 2. Surfactantes Biológicos. 3. Consorcio. 4. Hidrocarbonetos. I. Título.

CDD: 572

LIZETH MERCEDES MOLINA HERRERA

**PROSPECÇÃO DE ATIVIDADE BISSURFACTANTE E BIOEMULSIFICANTE DE
BACTÉRIAS DE SOLO DE MANGUEZAL E SEUS METABOLITOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Leiz Maria Costa Veras (Orientadora)
Universidade Federal de Piauí (UFPI)

Dra. Alyne Rodrigues de Araújo
Universidade Federal Delta do Parnaíba (UFDPAR)

Profa.Dra. Jessica Lucinda da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.
A os meus pais.
A meu irmão.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me ensinar que tudo é possível sempre que você quer do coração.

Aos meus pais, Victor e Nilda, por me amarem com todas as suas forças, por serem minha força e apoio a todo momento. Tudo o que sou é graças a vocês, eu amo vocês com toda a minha alma, são toda minha vida.

Ao meu irmãozinho Mauricio por sentir tanto a minha falta, você me orgulha todos os dias, eu te admiro e te adoro.

À minha orientadora Profa. Dra. Leiz Maria Costa Veras, obrigada por acreditar em mim e por me dar a oportunidade de realizar este projeto. Meus mais sinceros agradecimentos.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Rosa Helena Rebouças, obrigada pela infinita paciência, por sempre me encorajar e por me ensinar o incrível mundo da microbiologia. Obrigada por compartilhar seu tempo e experiência comigo dentro e fora do laboratório. Obrigada por me ajudar a crescer e melhorar como pessoa e como profissional.

Aos participantes da banca examinadora Dra. Alyne Rodrigues de Araújo e Dra. Jessica Lucinda da Silva, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos meus primos Erick e Jaime, e meus tios Angel e Beatriz, pela confiança e ajuda para alcançar esse objetivo, sem vocês isso não seria possível. A meu irmão Ruben, você e a minha inspiração, meu exemplo para nunca desistir. Um beijo no céu meu anjo.

Aos meus amigos estrangeiros, Camila, Caterine, Ricardo, Boris, Maria, Ana e Manuel, obrigado por viver essa experiência comigo, pelos bons momentos, risadas, brigas, medos e pelas memórias inesquecíveis que vocês deixaram na minha vida, nós conseguimos.

A Marjory, obrigada por me ajudar todo esse tempo, por sua amizade e por sua perseverança. Pelos triunfos e pelas derrotas que não deixamos que nos parassem, obrigada por não desistir.

A João e Edmar, obrigada por toda a ajuda, por cuidar de mim e me ouvir, por sempre ter um abraço e um sorriso para mim. Obrigada por ser minha família brasileira junto com a Marjory e a melhor pessoa do mundo Rosa Helena Rebouças.

A Karen, obrigada pelas viagens, pelas conversas, pelas risadas e as lágrimas, por trazer um pouco da nossa Bolívia com você. Obrigada por nos encontrar tão longe de casa e por tornar a saudade do Chuquiago Marka mais suportável. Não esqueça que nadie se cansa, nadie se rinde.

Aos que disponibilizaram um pouco do seu tempo para me apoiarem, Thales, Jarder, Guilherme e Ketlen.

A o senhor Adriano, obrigada por me ajudar em tudo o que pôde.

A Coordenação do mestrado de Biotecnologia, obrigada por me desafiar dia a dia, por exceder todas as minhas expectativas e me permitir adquirir conhecimentos valiosos

A Organização dos Estados Americanos (OEA) obrigada pela confiança, apoio e por me escolher entre tantos candidatos e por me dar a oportunidade de chegar ao Brasil.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de pesquisa.

“Un sueño para animarme
Una poesía para embellecerme
Una ilusión para hacerme fuerte
Así venceré a la muerte”
(José Mauro de Vasconcelos)

RESUMO

O grande impacto ambiental causado pela contaminação por derramamento de petróleo e seus derivados despertou grande interesse em fontes naturais que podem ser utilizadas na remediação de solos e águas afetadas. Os microrganismos, como fonte principal de recurso biotecnológico, tornaram-se uma ótima alternativa para a produção de biossurfactantes e bioemulsificantes, os quais tem histórico de atividades bioativas. Tivemos como objetivo realizar uma prospecção de bactérias oriundas de solo de manguezal que sofra influência da radiação solar e que seja impactado com a presença de hidrocarbonetos para avaliar a resistência e produção de biossurfactantes das cepas e seus metabolitos. As bactérias e seus líquidos metabólicos foram submetidos para: teste do colapso da gota, teste de Parafilm M, deslocamento de óleo, índice, estabilidade e atividade de emulsificação com querosene e óleo mineral como fontes de carbono. Um total de 82 cepas foram isoladas de dois pontos de coleta do solo de manguezal no Porto dos Tatus (Ilha Grande-Piauí), denominados P1 e P2. A partir do crescimento bacteriano em ágar *Plate Count Agar* (PCA) foi realizada a contagem e observação da morfologia das colônias para isolamento da maior diversidade bacteriana produtora de biossurfactantes. Em seguida os isolados foram caracterizados mediante a técnica coloração de Gram. Com relação à característica morfotintorial, todas as cepas são bastonetes Gram positivos. Para atividade de resistência a radiação UV, foram testadas 47 cepas, das quais, 15 cepas do ponto um (P1) apresentaram resistência a 5 e 15 min. de exposição a UV e 10 cepas do ponto dois (P2) apresentaram resistência aos 5 e 15 min. de exposição. Para os testes do colapso da gota e índice de emulsificação foram testadas 37 bactérias (20 do P1 e 17 do P2) que foram crescidas em caldo Bushnell-Hass salino (BH salino) acrescido de 2% de querosene e 2% de óleo mineral. As cepas testadas apresentaram potencial de crescimento na presença do querosene e óleo mineral. Para os testes do colapso da gota com querosene 15 cepas deram positivo e 17 deram positivo com o líquido metabólico. Para o óleo mineral como fonte de carbono 16 deram positivo (11 do P1 e 5 do P2) e com o líquido metabólico 4 deram positivo (3 do P1 e 1 do P2). Para o índice de emulsificação se testaram os líquidos metabólicos, 7 cepas apresentaram resultados acima do 40% com querosene e 12 cepas apresentaram resultados acima do 40% com óleo mineral. Foram escolhidas 8 cepas que apresentaram os melhores resultados, 4 foram identificadas como *Bacillus sp.*, e as oito foram testadas para atividade de emulsificação, estabilidade de emulsificação, teste de Parafilm M e deslocamento de óleo. Observou-se que todas apresentam resistência a radiação UV, seis apresentam potencial emulsificante com algumas características de biossurfactante e duas apresentam potencial biossurfactante com pouca atividade bioemulsificante. Para melhorar a capacidade das cepas, foi realizado um teste de antagonismo pela técnica *Cross Streak Plate*, foram formados três consórcios com as cepas que conseguiram se aproximar e todos os testes foram repetidos. Observou-se que dois dos consórcios conseguem melhorar as atividades de emulsificação e surfactante, apresentando maiores resultados que as bactérias separadamente.

Palavras-chave: Microrganismos. Surfactantes Biológicos. Consorcio. Hidrocarbonetos.

ABSTRACT

The great environmental impact caused by contamination by oil spills and their derivatives has aroused great interest in natural sources that can be used in the remediation of affected soils and waters. Microorganisms, as the main source of biotechnological resources, have become a great alternative to produce biosurfactants and bioemulsifiers, which have a history of bioactive activities. We aimed to conduct a survey of bacteria from mangrove soil that is influenced by solar radiation and that is impacted by the presence of hydrocarbons to assess the resistance and production of biosurfactants of the strains and their metabolites. The bacteria and their metabolic liquids were submitted to drop collapse test, Parafilm M test, oil displacement, index, stability and emulsification activity with kerosene and mineral oil as carbon sources. A total of 82 strains were isolated from two mangrove soil collection points in Porto dos Tatus (Ilha Grande-Piauí), named P1 and P2. From the bacterial growth on Plate Count Agar (PCA), counting and observation of colony morphology was performed to isolate the greatest bacterial diversity producing biosurfactants. Then the isolates were characterized using the Gram stain technique. Regarding the morphotintorial characteristic, all strains are Gram positive rods. For resistance activity to UV radiation, 47 strains were tested, of which, 15 strains from point one (P1) showed resistance at 5- and 15- min. of exposure to UV and 10 strains of point two (P2) showed resistance at 5 and 15 min. exposure. For the drop collapse and emulsification index tests, 37 bacteria (20 from P1 and 17 from P2) were tested and grown in saline Bushnell-Hass broth (BH saline) plus 2% kerosene and 2% mineral oil. The strains tested showed growth potential in the presence of kerosene and mineral oil. For the tests of the collapse of gout with kerosene, 15 strains were positive and 17 were positive with the metabolic fluid. For mineral oil as a carbon source 16 were positive (11 from P1 and 5 from P2) and with metabolic liquid 4 they were positive (3 from P1 and 1 from P2). Metabolic fluids were tested for the emulsification index, 7 strains showed results above 40% with kerosene and 12 strains showed results above 40%) with mineral oil. Eight strains were chosen that presented the best results, 4 were identified as *Bacillus* sp., And the eight were tested for emulsification activity, emulsification stability, Parafilm M test and oil displacement. We observed that all of them have resistance to UV radiation, six have emulsifying potential with some characteristics of biosurfactant and two have biosurfactant potential with little bioemulsifying activity. To improve the capacity of the strains, an antagonism test was performed using the Cross Streak Plate technique, three consortia were formed with the strains that managed to get close and all tests were repeated. It was observed that two of the consortia manage to improve the activities of emulsification and surfactant, presenting greater results than the bacteria separately.

Keywords: Microorganisms. Biological surfactants. Consortium. Hydrocarbons.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática dos grupos hidrofílico e hidrofóbico do surfactante	19
Figura 2. Estruturas químicas de alguns biossurfactantes.....	21
Figura 3. Pontos da coleta P1 e P2.....	23
Figura 4. Método de diluições para monitoramento de crescimento microbiano.....	24
Figura 5. Estruturas das bactérias observadas em microscópio de lente de imersão. Após a Coloração de Gram.....	35
Figura 6. Ilustração da pigmentação bacteriana a partir do crescimento ágar PCA inclinado...	36
Figura 7. Porcentagem das cromogêneses das cepas dos pontos P1 e P2	36
Figura 8. Resistencia das bactérias de P1 expostas a radiação UV durante 5 e 15 min.....	37
Figura 9. Resistencia das bactérias de P2 expostas a radiação UV durante 5 e 15 min.....	38
Figura 10. Resultados do teste de exposição a radiação ultravioleta das cepas P2-17 e P2-23.	39
Figura 11. Colapso da gota do liquido metabólico das bactérias de P1 e P2 em querosene e óleo mineral.....	40
Figura 12. . Índice de emulsificação das cepas do ponto P1 com querosene e óleo mineral...	42
Figura 13. . Índice de emulsificação das cepas do ponto P2 com querosene e óleo mineral...	42
Figura 14. Estabilidade de Emulsificação do P1 e P2 até 96 horas com querosene.....	44
Figura 15. . Estabilidade de Emulsificação do P1 e P2 até 96 horas com óleo mineral	44
Figura 16. Teste de Parafilm M	46
Figura 17. Teste de Antagonismo das cepas	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características morfológicas e morfotintorial dos isolados bacterianos oriundos do solo de manguezal no ponto de coleta P1.....	30
Tabela 2. Características morfológicas e morfotintorial dos isolados bacterianos oriundos do solo de manguezal no ponto de coleta P2.....	33
Tabela 3. Crescimento das cepas escolhidas.....	39
Tabela 4. Resultados da atividade e estabilidade de emulsificação	43
Tabela 5. Resultados de teste Parafilm M, CDG e dispersão de óleo	45
Tabela 6. Resultados do teste de antagonismo	46
Tabela 7. Resultados dos consórcios nos testes de índice, estabilidade e atividade de emulsificação.....	47
Tabela 8. Resultado dos consórcios nos testes de CDG, Parafilm M e dispersão de óleo.	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: A biotecnologia e suas aplicações	18
--	----

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 Biotecnologia e microrganismos	18
3.2 Poluição Ambiental	19
3.3 Surfactantes	19
3.4 Biossurfactantes	20
3.5 Classificação dos biossurfactantes	20
3.6 Bioemulsificantes	22
3.7 Classificação dos bioemulsificantes	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Coleta das amostras	23
4.2 Processamento das amostras	23
4.3 Quantificação de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC)	24
4.4 Análise morfológica das colônias	24
4.5 Caracterização morfotintorial	25
4.6 Teste de resistência à radiação ultravioleta (UV)	25
4.7 Produção de biossurfactantes e bioemulsificantes	25
4.8 Teste de antagonismo através da técnica de estrias cruzadas (Cross Streak Plate)	28
4.9 Consórcio bacteriano	28
4.10 Tratamento Estatístico	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Quantificação da carga microbiana	29
5.2 Análise morfológica e tintorial das colônias	29
5.3 Teste de resistência UV	37
5.4 Produção de biossurfactantes e bioemulsificantes	40
5.5 Teste de Antagonismo	46
5.6 Produção de Biossurfactantes e Bioemulsificantes no consorcio	47
6. CONCLUSÕES	49

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

O petróleo e seus derivados são utilizados mundialmente como principal recurso em diversos setores, como o industrial e do transporte, sendo o solo e o mar os meios afetados pelo derramamento acidental de grandes quantidades desses produtos. (CHINEAU et al, 2003; SING et al, 2006).

Como fonte de biorremediação tem-se bactérias que são procariotos microscópicos que apresentam uma vasta diversidade metabólica responsável por sua adaptação de vida em ambientes com as mais variadas características físicas e químicas. Essa versatilidade metabólica chama atenção para a potencial aplicabilidade biotecnológica da célula e/ou seus produtos metabólicos nos mais variados seguimentos industriais (ARAUJO et al., 2017; HU et al., 2018; MARELLA et al., 2018; PRAKASHAM e KUMAR, 2019; SEKUROVA et al., 2019).

O estado do Piauí possui uma extensa área de mangue que se encontra em parte dentro da Área de Proteção Ambiental (APA) do Delta do Parnaíba, possuindo importância como patrimônio ecológico, apresentando relevante potencial turístico e de exploração dos recursos pesqueiros. Esse ecossistema é suscetível ao aporte de esgotos industriais, domésticos e da atividade náutica que podem carrear para este ambiente, uma gama de contaminantes incluindo os hidrocarbonetos derivados do petróleo (BRASIL, 2002; SILVA, 2009; SOUSA, 2010).

Devido à forte influência antrópica nesse frágil ecossistema de manguezal, acreditamos que os microrganismos que habitam naturalmente este ambiente possuam adaptações específicas e um grande potencial para degradação de hidrocarbonetos, resistência a radiação ultravioleta (UV) e atividade surfactante e emulsificante.

Portanto, o objetivo desta pesquisa foi realizar uma prospecção de bactérias em solo de manguezal que sofra influência da radiação solar e aporte de derivados de hidrocarbonetos, buscando bioatividade bacteriana e/ou seus extratos metabólicos que possuam interesse biotecnológico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o potencial de bactérias e seus metabolitos para atividades de resistência à radiação ultravioleta e atividades biossurfactantes e bioemulsificantes.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar bactérias do solo do manguezal com incidência de radiação solar e hidrocarbonetos;
- Realizar a caracterização morfológica dos isolados bacterianos;
- Verificar a resistência bacteriana frente à presença de radiação ultravioleta em diferentes tempos;
- Verificar a atividade bacteriana com diferentes fontes de carbono (querosene e óleo mineral);
- Testar a atividade dos metabolitos das bactérias frente à querosene e óleo mineral;
- Otimizar a produção de biossurfactantes e bioemulsificantes mediante consórcios bacterianos;
- Testar a atividade dos consorcio frente à hidrocarbonetos.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Biotecnologia e microrganismos

A biotecnologia tem sido caracterizada por unir conhecimento e protocolos de pesquisa que já existem com novos procedimentos e pesquisas científicas derivadas de várias disciplinas, como química, bioquímica, biologia molecular e celular. (KREUZER e MASSEY, 2002). O uso, a mudança e a otimização dos organismos vivos ou de suas partes celulares, para criar produtos, processos e aplicações na saúde humana e animal, na agricultura e no meio ambiente são permitidos por meio de um conjunto de tecnologias de apoio para diferentes aplicações de biotecnologia. (Quadro 1) (JUDICE e BAËTA, 2005).

Quadro 1: A biotecnologia e suas aplicações

Segmento da biotecnologia	Aplicação
Saúde Humana	Diagnósticos, medicamentos, vacinas, utilização de biodiversidade
Saude animal	Veterinária, vacinas, probióticos, nutrição animal, aquicultura
Agribusiness	Genética de plantas, transgênicos, produtos florestais, ornamentais, medicinais, bioinseticidas, biofertilizantes, inoculantes
Meio ambiente	Biorremediação, tratamento de resíduos, análises
Instrumental complementar	Software, internet, bioinformática, P&D, consultorias
Insumos industriais	Química fina, enzimas, alimentos
Em sinergia	Biomateriais, biomedicina, nanobiotecnologia
Fornecedores	Equipamentos, insumos e matérias primas

Fonte: JUDICE e BAËTA, 2005.

A biotecnologia é o resultado da coleção maciça de células, microrganismos ou componentes celulares, esses microrganismos são produtores de produtos como

surfactantes que podem ser usados como matéria-prima barata evitando a necessidade de processos caros e reduzindo os resíduos tóxicos, levando a um desenvolvimento e interesse atual entre as indústrias e pesquisa microbiológica em estudar suas qualidades especiais (TORTORA et al.,2005).

3.2 Poluição Ambiental

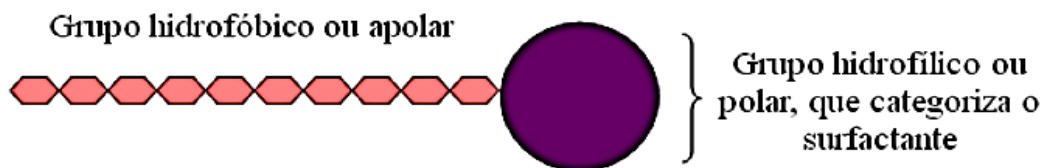
A maior disseminação de poluição ambiental no mundo é atribuída aos hidrocarbonetos devido a derramamentos, acidentes, vazamentos e rupturas nos vários procedimentos de exploração, produção e transporte de petróleo (SING et al.,2006). O solo, a água, o ar, a vegetação e a vida selvagem afetados por derramamentos são difíceis de reverter e os processos de descontaminação natural ocorrem muito tempo após a contaminação (ORTEGA, 2012).

O meio ambiente, os ecossistemas e a saúde dos seres vivos foram prejudicados e ameaçados pela poluição causada por hidrocarbonetos, razão pela qual é necessário aplicar avanços tecnológicos de remediação que possuam características de custo práticas e competitivas (MAKKAR e ROCKNE, 2009).

3.3 Surfactantes

Os surfactantes são moléculas anfipáticas que possuem uma combinação hidrofílica (polar) e hidrofóbica (não polar, geralmente hidrocarboneto) como na Figura 1, que causa uma interface entre as fases fluidas com diferentes graus de polaridade e ligações de hidrogênio que podem ser interfaces óleo /água ou ar /água (DESAI E BANAT, 1997; GREEK, 1991).

Figura 1. Representação esquemática dos grupos hidrofílico e hidrofóbico do surfactante



Fonte: Santos, 2012

É devido a essas propriedades que os surfactantes têm a capacidade de diminuir a tensão superficial e a interface e, assim, formar uma microemulsão que permite que os hidrocarbonetos se solubilizem na água e vice-versa. Essas características fornecem excelentes atividades de emulsificação, detergência, formação de espuma e dispersão (DESAI E BANAT, 1997; GAUTAM e TYAGI, 2006).

3.4 Biossurfactantes

Os compostos anfífilos de origem microbiana com a capacidade de diminuir a tensão superficial como surfactante e têm a propriedade de produzir emulsificante são chamados biossurfactantes e bioemulsificantes. Ao contrário dos surfactantes sintéticos, os biossurfactantes são mais ecológicos devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e eficácia a temperaturas ou pH extremos. Todas essas condições favoráveis tornam os biossurfactantes potenciais moléculas com desempenho eficaz e aplicável em vários campos da indústria (CAMEOTRA et al., 1998; NITSCHKE E PASTORE, 2002).

3.5 Classificação dos biossurfactantes

Os biossurfactantes podem ser classificados de acordo com sua origem microbiana e estrutura química. Entre as principais classes estão as que contêm glicolipídios, lipoproteínas, lipopetídeos, ácidos graxos, fosfolipídios, surfactantes particulados e surfactantes poliméricos, figura 2 (DESAI E DESAI, 1993).

a) Glicolipídios

Os glicolipídios são constituídos por carboidratos (glicose, ramnose, galactose e mannose) com uma longa cadeia de ácidos e ácidos hidroxila. Eles são os mais conhecidos e estudados (ramnolipídios, trealolipídios e soforólípides). Os glicolipídios têm um grau de polaridade em função dos hidrocarbonetos utilizados como substratos, possuem compostos de carga aniônicos, causam alterações na membrana bacteriana e são excelentes agentes surfactantes. (DESAI Y BANAT, 1997).

3.6 Bioemulsificantes

Bactérias de vários gêneros são produtores de polímeros de alto peso molecular chamados bioemulsificantes, que são caracterizados pela formação e estabilização de emulsões de água em óleo ou vice-versa de forma eficaz, embora nem sempre reduzam a tensão superficial. Estes bioemulsificantes são compostos de proteínas, lipoproteínas, polissacarídeos, lipopolissacarídeos e misturas complexas desses biopolímeros (GUDIÑA et al., 2015; ROSENBERG E RON, 1998).

3.7 Classificação dos bioemulsificantes

a) Família emulsan

O emulsan é um complexo extracelular de polissacarídeo acilado produzido potencialmente por bactérias Gram-negativas; o mais estudado é o *Acinetobacter* por ser um bioemulsificador polimérico mais eficaz para hidrocarbonetos na água em concentrações tão baixas quanto 0,001-0,01%. É composto por um esqueleto de polissacarídeo com cadeias laterais de ácidos graxos ligadas ao O-acil e N-acil. (PANILAITIS et al., 2007; MNIF E GHRIBI, 2015b).

b) Exopolissacarídeos

Os exopolissacarídeos (EPS) são polímeros de carboidratos de alto peso molecular que produzem polímeros extracelulares que cercam a célula da maioria dos microrganismos marinhos, ajudando-os a suportar condições ambientais extremas e a melhorar sua sobrevivência (MANCUSO et al., 2005c; SATPUTE et al., 2008).

c) Biossurfactantes particulados

Os biossurfactantes particulados são vesículas extracelulares da membrana que são liberadas por várias bactérias. Eles têm a capacidade de separar moléculas de hidrocarbonetos na forma de microemulsões, algumas dessas partículas podem ser sintetizadas e aderidas à superfície da célula, fazendo com que ela atue como um bioemulsificante (DESAI Y BANAT, 1997; MNIF E GHRIBI, 2015b).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras

No mês de abril de 2019 foram coletadas amostras de solo de manguezal no Porto dos Tatus (Ilha Grande – Piauí). As amostras foram coletadas em dois pontos distintos em área perpendicular a linha da costa de acordo com as coordenadas geográficas (GPSmap 60CSx) P1 02°49.943'S e 041°49.764'W e P2 02°49.853S e 041°49.852'W. (Figura 1)

O solo foi coletado com o auxílio de uma colher e acondicionado em frascos estéreis, sendo encaminhados ao Campus Ministro Reis Velloso onde foram imediatamente processados.

Figura 3. Pontos da coleta P1 e P2



A: P1 (02°49.943'S e 041°49.764'W).



B: P2 (02°49.853S e 041°49.852'W).

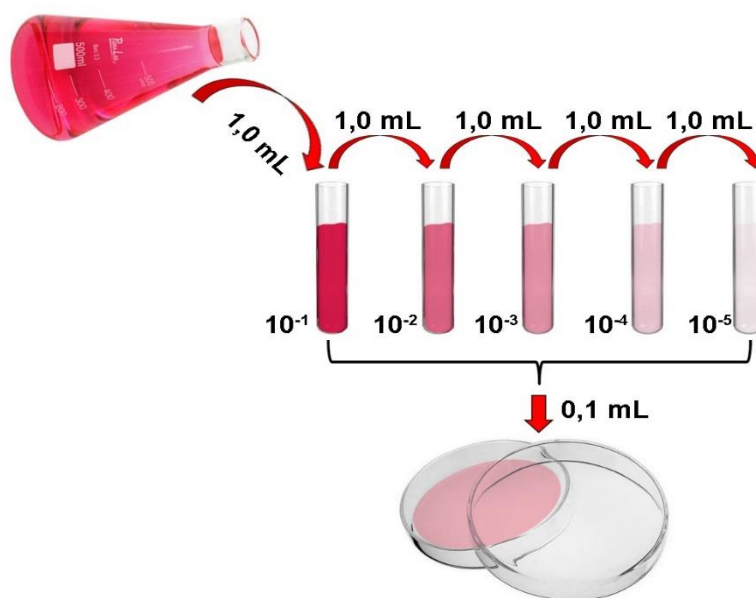
Fonte: Autoria própria

4.2 Processamento das amostras

Foram pesados 10 g da amostra de solo que foram transferidos para um Erlenmeyer contendo 90 mL de água do mar (10 ppm) procedendo-se a homogeneização por 10 min. Esta correspondeu à diluição 10^{-1} sendo em seguida preparadas as diluições

seriadas até 10^{-5} . Todos os meios de cultura utilizados foram diluídos com água do mar 10 ppm.

Figura 4. Método de diluições para monitoramento de crescimento microbiano



4.3 Quantificação de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC)

A partir das diluições seriadas foram inoculadas placas de Petri contendo ágar *Plate Count Agar* 10 ppm (PCA 10 ppm) pela técnica do espalhamento em superfície (*Spread Plate*). As placas foram incubadas a 28 °C/48 h. Após esse período de tempo as placas que apresentarem número de colônias entre 25 e 250 colônias foram contadas para o cálculo das unidades formadoras de colônias por grama de solo de acordo com a fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de UFC} = \text{número de colônias contadas} \times \text{inverso da diluição} \times \text{FC}$$

4.4 Análise morfológica das colônias

As colônias crescidas no ágar PCA 10 ppm que apresentarem qualquer tipo de pigmentação foram repicadas para placas de Petri contendo ágar Nutriente 10 ppm (AN

10ppm) e incubadas a 28 °C/24 h. Após esse período, as colônias foram analisadas quanto ao tamanho, forma, relevo, rugosidade e cromogênese.

4.5 Caracterização morfotintorial

As cepas repicadas com crescimento de 24 h foram submetidas ao protocolo de coloração de Gram. Para observação das suas características celulares de forma e tipo de parede celular apresentada e verificação da pureza do isolado.

4.6 Teste de resistência à radiação ultravioleta (UV)

As cepas foram repicadas em tubos de ensaio contendo AN 10ppm inclinado e o inóculo ajustado de acordo com a Escala de McFarland 0,5. Em seguida com o auxílio de um swab estéril foram inoculadas placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton 10 ppm (MH 10ppm). Na superfície da placa de Petri ágar foi aplicado um molde vazado para proteção da área coberta e permitindo a incidência de radiação UV na área exposta. Estas placas serão expostas a radiação UV em diferentes períodos de tempo (5 e 15 min). Após a exposição a radiação UV as placas foram incubadas a 28 °C/24 h. (SÁBER, 2010 adaptado).

4.7 Produção de biossurfactantes e bioemulsificantes

A produção de biossurfactantes foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Lima e Silva et al. (2010) com adaptações, as cepas foram repicadas em tubos de ensaio contendo Luria Bertani - LB 10ppm e incubados a 28 °C/24 h. Após incubação, o inóculo foi transferido para tubos de ensaio contendo 10mL de Caldo Bushnell-Hass 10ppm (CN 10ppm) acrescido de 2% de querosene (v/v) previamente esterilizados por filtração em membranas de 0,22 µm e 2% de óleo mineral (v/v) previamente tinalizado. Os tubos serão incubados a 28 °C/72 h. Após o tempo de incubação serão selecionadas para os testes de degradação dos hidrocarbonetos somente aquelas capazes de se desenvolverem na presença do querosene e óleo mineral. Após as 72 horas de incubação foi realizada a separação da biomassa por centrifugação do meio de cultura a uma

velocidade de 3600 RPM. por 60 minutos. O sobrenadante das culturas bacterianas ou líquido metabólico (LM) foi separado para os testes de hidrocarbonetos.

a) Colapso da gota

O teste foi realizado segundo a metodologia descrita por Bodour e Miller-Maier (1998). Uma alíquota de 10 µL de óleo de motor Castrol @5W30 e de óleo mineral serão aplicados nos poços de uma microplaca de 96 poços seguido de descanso por 24 horas. Em seguida, 10 µL das cepas e dos seus líquidos metabólicos serão dispensados (em triplicata) nos poços untados dos. Após 1 minuto, o comportamento da gota em contato com a superfície hidrofóbica foi verificado. O espalhamento ou o colapso da gota quando depositada na placa untada com óleo será interpretado como positivo, indicativo da possível redução da tensão superficial, característica dos biossurfactantes.

b) Índice de emulsificação (IE)

Foi utilizada a metodologia descrita por Das, Das e Mukherjee (1998), com modificações. Em tubos de 12 mm x100 mm foram adicionados 2 mL do líquido metabólico e 2mL de óleo mineral, nos outros tubos foram adicionados 2mL do líquido metabólico e 2mL de querosene. Os tubos foram agitados por 2 minutos utilizando-se agitador de tubos do tipo vórtex e deixados em repouso pelo mesmo período. Após o descanso, foi medida a altura da camada emulsificada. A emulsão foi medida após 24 horas para determinação do índice de emulsificação (IE) utilizando-se a fórmula IE(%). Foram consideradas boas emulsões aquelas que após 24 horas de formadas mantivessem IE maior ou igual a 40% da emulsão formada após os 2 minutos de agitação (BOSCH et al., 1998).

$$IE(\%) = \frac{\text{altura da emulsão (mm)} \times \text{area da seccão transversal (mm}^2\text{)}}{\text{volume total (mm}^3\text{)}} \times 100$$

c) Estabilidade da emulsão (ES)

Foi acompanhado o comportamento das emulsões através de medições até 96 horas para determinação da sua estabilidade através da fórmula ES(%) descrita por Fennema (1985). Foram consideradas boas emulsões aquelas que após 24 horas de formadas mantivessem ES maior ou igual a 50% da emulsão formada após os 2 minutos de agitação.

$$ES(\%) = \frac{\%VEt}{\%VE0} \times 100$$

d) Atividade de emulsificação

Este teste foi realizado segundo a técnica descrita por Cirigliano e Carman (1984), com modificações. Em tubos de ensaio com tampa de rosca serão adicionados 2 mL de líquido metabólico (LM), 2 mL de tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 3) e 1 mL de óleo mineral e também pela segunda fonte de carbono serão adicionados. 2mL de líquido metabólico, 2 mL de tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 3) e 1 mL de querosene. Os tubos serão agitados por 2 minutos e permanecerão em repouso pelo período de 10 minutos. Em seguida, a emulsão formada será lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm. O resultado será expresso em Unidades de Atividade de Emulsificação (U.A.E.).

e) Teste de Parafilm M

Este teste foi realizado segundo a técnica descrita por Kalyani et.al (2014) com modificações. Foi adicionada uma gota de azul de metileno a 2 mL de líquido metabólico. Em seguida, 10 µL desta mistura foram retirados e colocados em um fragmento de Parafilm-M, deixando uma gota imperturbável sobre ele. A forma da gota foi examinada 1 minuto após ser colocada no Parafilm-M. Se a gota mantiver sua forma, será considerada negativa; se a queda for plana ou "colapsar", será considerada positiva.

Os seguintes níveis de resposta encontrados neste teste foram estabelecidos: (-) não altera sua forma; (+) a queda cai após 1 minuto; (++) a gota entra em colapso aos 30 segundos, (+++) a gota entra em colapso imediatamente.

f) Atividade de dispersão de óleo

Este teste foi realizado segundo a técnica descrita por Morikawa et al. (2000). Foram colocados 5 mL de água destilada em uma placa de Petri e em seguida, 40 µL de óleo de motor foram colocados na superfície da água, formando uma camada homogênea. Imediatamente 40 mL de líquido metabólico foram adicionados ao centro da camada bruta. A dispersão do óleo na água foi considerada uma resposta positiva, quando uma área clara foi observada na camada de óleo, na forma de um halo e mantida por um minuto.

As cepas foram classificadas de acordo com o tamanho do halo formado na camada oleosa da seguinte forma: (-) sem dispersão oleosa; (+) dispersão de óleo com um halo entre 0,5 cm e 0,9 cm; (++) dispersão de óleo com um halo entre 1 cm e 1,5 cm; (+++) dispersão de óleo com um halo entre 1,5 cm <X <2,1 cm; (++++) dispersão de óleo com halo entre 2,1 <X <3 cm.

4.8 Teste de antagonismo através da técnica de estrias cruzadas (Cross Streak Plate).

Foi feito um inóculo central (estria) de cada bactéria sobre a superfície do ágar nutriente. Depois foram feitos inóculos com os outros isolados perpendiculares a primeira estria (mantendo distância de 1 cm da linha principal). O resultado foi observado após incubação a 35 °C por 24 h. A atividade antagonista foi verificada através da inibição do crescimento da estria central.

4.9 Consórcio bacteriano

As bactérias com resultado negativo no teste de antagonismo foram selecionadas e formarão um consórcio para realizar todos os testes de degradação de hidrocarbonetos do ponto 4.7.

4.10 Tratamento Estatístico

A estatística descritiva foi utilizada para apresentação dos resultados do teste da atividade de emulsificação das cepas. O teste não paramétrico de Mann Whitney foi aplicado para verificar se houve diferença significativa entre os compostos hidrofóbicos testados (querosene e óleo mineral) na determinação do índice de emulsificação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Quantificação da carga microbiana

Os microrganismos respondem às diferentes condições climáticas do solo, tais como os níveis de temperatura, a disponibilidade de água que existe e o fluxo de calor, como localização geográfica, teor de matéria orgânica, umidade, pH, temperatura e tipo de solo, que influenciam o crescimento dos mesmos no solo. (RODRIGUES et al., 2011; e ARIFUZZAMAN et al., 2010).

Para a quantificação das colônias, as placas foram retiradas e com ajuda de um contador de colônias, foi realizado a contagem das colônias que apresentavam entre 25 e 250 colônias. Foram escolhidas para o P1 a diluição (-3) com 46 colônias e para P2 a diluição (-1) com 62 colônias. A carga bacteriana total do ponto P1 foi maior que a carga bacteriana do ponto P2 nas amostras de solo coletadas. A contagem média de bactérias BHC do ponto P1 foi $4,6 \times 10^4$ UFC g⁻¹ e no ponto P2 foi $6,2 \times 10^2$ UFC g⁻¹ das respectivas áreas.

Como os resultados obtidos por Rodrigues et al. (2011) de maior carga bacteriana do solo na Floresta Nacional de Caxiuanã, Pará, nas coletas que apresentaram maior impacto de água e radiação solar do que áreas secas, a área de P1 que possui as mesmas condições obteve maior carga bacteriana que a área P2.

5.2 Análise morfológica e tintorial das colônias

Do ponto P1 e P2 foram observadas e selecionadas 50 e 32 colônias (respectivamente) com características morfológicas e tintoriais bacterianas distintas. A descrição dessas características encontra-se descrita na tabela 1.

Tabela 1. Características morfológicas e morfotintorial dos isolados bacterianos oriundos do solo de manguezal no ponto de coleta P1.

Ponto 1	Característica da colônia			Característica celular		
	Cor	Tamanho	Borda	Formato	Parede celular	Formação esporo
1	Creme	Mediana	Redonda, brilhante e convexa	Bastonete	Gram positiva	S.E
2	Amarela	Mediana	Redonda, brilhante e convexa	Bastonete	Gram positiva	S.E
3	Transparente	Pequena	Redonda, opaca e plana	Bastonete	Gram positiva	S.E
4	Rosa	Pequena	Redonda, brilhante e convexa	Bastonete	Gram positiva	S.E
5	Branca	Grande	Redonda, opaca e plana	Bastonete	Gram positiva	S.E
6	Rosa claro	Pequena	Redonda, brilhante e convexa	NA		S.E
7	Branca	Mediana	Redonda, brilhante e afundada	Bastonete	Gram positiva	S.E
8	Branca	Grande	Irregular, opaca e plana	Bastonete	Gram positiva	S.E
9	Marrom	Pequena	Redonda, brilhante e plana	Bastonete	Gram positiva	S.E
10	Marrom	Pequena	Redonda, brilhante e convexa	Bastonete	Gram positiva	S.E
11	Amarela	Mediana	Redonda, brilhante e convexa	Bastonete	Gram positiva	S.E
12	Marrom	Mediana	Irregular, plana e brilhante	Bastonete	Gram positiva	S.E
13	Branca	Pequena	Redonda, brilhante e convexa	Bastonete	Gram positiva	S.E
14	Amarela	Mediana	Redonda, brilhante e convexa	Bastonete	Gram positiva	S.E

15	Amarela	Grande	Redonda, brilhante e convexa	Bastonete	Gram positiva	Esporos
16	Amarela	Pequena	Redonda, brilhante e convexa	Bastonete	Gram positiva	S.E
17	Creme	Grande	Redonda, brilhante e plana	Bastonete	Gram positiva	S.E
18	Transparente	Grande	Irregular, opaca e plana	Bastonete	Gram positiva	Esporos
19	Amarela	Mediana	Redonda, espalhada e brilhante	Bastonete	Gram positiva	S.E
20	Amarela	Pequena	Redonda, brilhante e convexa	Bastonete	Gram positiva	S.E
21	Creme	Mediana	Redonda, brilhante e convexa	Bastonete	Gram positiva	S.E
22	Rosa	Pequena	Redonda, brilhante e convexa	Bastonete	Gram positiva	S.E
23	Rosa claro	Pequena	Redonda, brilhante e convexa	Bastonete	Gram positiva	S.E
24	Blanca	Pequena	Redonda, brilhante e convexa	Bastonete	Gram positiva	S.E
25	Rosa	Mediana	Redonda, brilhante e convexa	Bastonete	Gram positiva	S.E
26	Marrom claro	Mediana	Redonda, regular	Bastonete	Gram positiva	Esporos
27	Branca	Grande	Redonda e irregular	Bastonete	Gram positiva	S.E
28	Rosa claro	Mediana	Irregular e plana	Bastonete	Gram positiva	S.E
29	Amarelo claro	Mediana	Redonda e regular	Bastonete	Gram positiva	S.E
30	Transparente	Pequena	Redonda e regular	Bastonete	Gram positiva	S.E
31	Amarelo	Mediana	Redonda e irregular	Bastonete	Gram positiva	S.E
32	Rosa	Pequena	Redonda e irregular	Bastonete	Gram positiva	S.E

33	Rosa	Mediana	Redonda e irregular	Bastonete	Gram positiva	S.E
34	Branca	Mediana	Redonda e regular	Bastonete	Gram positiva	S.E
35	Branca	Grande	Redonda e irregular	Bastonete	Gram positiva	S.E
36	Marrom	Mediana	Redonda, brilhante e regular	Bastonete	Gram positiva	S.E
37	Marrom	Mediana	Redonda, brilhante e regular	Bastonete	Gram positiva	S.E
38	Amarelo claro	Mediana	Redonda e regular	Bastonete	Gram positiva	S.E
39	Rosa claro	Pequena	Redonda, brilhante e regular	Bastonete	Gram positiva	S.E
40	Rosa	Grande	Redonda e regular	Bastonete	Gram positiva	S.E
41	Branca	Pequena	Redonda, brilhante e regular	Bastonete	Gram positiva	S.E
42	Amarela	Mediana	Redonda e regular	Bastonete	Gram positiva	S.E
43	Transparente	Pequena	Redonda, brilhante e regular	Bastonete	Gram positiva	S.E
44	Branca claro	Pequena	Redonda, brilhante e regular	Bastonete	Gram positiva	S.E
45	Amarelo claro	Mediana	Redondo, brilhante e regular	Bastonete	Gram positiva	S.E
46	Branca	Mediana	Redonda e irregular	Bastonete	Gram positiva	S.E
47	Branca	Grande	Irregular e opaca	Bastonete	Gram positiva	S.E
48	Beige claro	Mediana	Redonda e irregular	Bastonete	Gram positiva	S.E
49	Beige claro	Mediana	Redonda, brilhante e regular	Bastonete	Gram positiva	Esporos
50	Branca	Grande	Redonda e irregular	Bastonete	Gram positiva	S.E

NA = não foi possível a visualização

Tabela 2. Características morfológicas e morfotintorial dos isolados bacterianos oriundos do solo de manguezal no ponto de coleta P2

Ponto 2	Característica da colônia			Característica celular		
	Cor	Tamanho	Borda	Formato	Parede celular	Formação esporo
1	Branca	Média	Redonda regular e	Bastonete	Gram positiva	S.E
2	Lilás	Pequena	Redonda, regular e convexa	Bastonete	Gram positiva	S.E
3	Lilás claro	Pequena	Redonda, regular e convexa	Bastonete	Gram positiva	S.E
4	Lilás	Pequena	Redonda, regular e convexa	Bastonete	Gram positiva	S.E
5	Lilás	Pequena	Redonda regular, convexa e brilhante	Bastonete	Gram positiva	S.E
6	Lilás	Pequena	Redonda regular, convexa e brilhante	Bastonete	Gram positiva	S.E
7	Branca	Pequena	Redonda, regular e brilhante	Bastonete	Gram positiva	S.E
8	Amarelo	Mediana	Redonda, regular e convexa	Bastonete	Gram positiva	Esporos
9	Amarelo	Mediana	Redonda regular, convexa e brilhante	Bastonete	Gram positiva	S.E
10	Transparente	Mediana	Redonda irregular e	Bastonete	Gram positiva	S.E
11	Amarelo	Mediana	Redonda, regular e convexa	Bastonete	Gram positiva	S.E
12	Transparente	Mediana	Redonda, irregular e convexa	Bastonete	Gram positiva	S.E
13	Lilás	Pequena	Redonda regular, convexa e brilhante	Bastonete	Gram positiva	S.E

14	Lilás	Pequena	Redonda regular, convexa e brilhante	Bastonete	Gram positiva	S.E
15	Branca	Mediana	Redonda, regular, centro afundado	Bastonete	Gram positiva	Esporos
16	Branca	Grande	Redonda e irregular	Bastonete	Gram positiva	S.E.
17	Branca	Mediana	Redonda, regular e plana	Bastonete	Gram positiva	Esporos
18	Branca	Pequena	Redonda regular, convexa e brilhante	Bastonete	Gram positiva	Esporos
19	Branca	Mediana	Redonda, regular e plana	Bastonete	Gram positiva	S.E
20	Branca	Mediana	Redonda e irregular	Bastonete	Gram positiva	S.E
21	Transparente	Mediana	Redonda, irregular e brilhante	Bastonete	Gram positiva	S.E
22	Branca	Pequena	Redonda, regular e convexa	Bastonete	Gram positiva	Esporos
23	Branca	Grande	Redonda, irregular e plana	Bastonete		Esporos
24	Branca	Pequena	Redonda regular, convexa e brilhante	Bastonete	Gram positiva	Esporos
25	Branca	Mediana	Redonda, regular e plana	Bastonete	Gram positiva	S.E
26	Branca	Mediana	Redonda, regular e plana	Bastonete	Gram positiva	S.E
27	Amarelo claro	Mediana	Redonda, irregular e plana	Bastonete	Gram positiva	S.E
28	Transparente	Pequena	Redonda e irregular	Bastonete	Gram positiva	S.E
29	Transparente	Pequena	Redonda, regular e plana	Bastonete	Gram positiva	S.E
30	Lilás	Pequena	Redonda, regular e convexa	Bastonete	Gram positiva	S.E

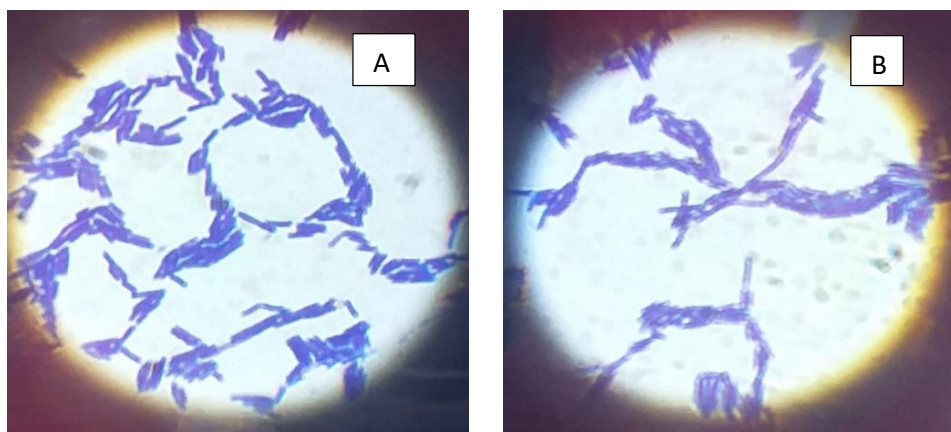
31	Transparente	Mediana	Redonda e regular	Bastonete	Gram positiva	Esporos
32	Branca	Grande	Redonda, irregular e plana	Bastonete	Gram positiva	S.E.

S.E. = sem esporos

Bactérias gram-positivas encontradas principalmente em solos têm a capacidade de crescer em condições extremas, como as encontradas no solo semiárido do nordeste brasileiro foram (ARAUJO et al., 2015). As bactérias do ponto P1 e do ponto P2 (figura 3) foram coradas por coloração de Gram, fotografadas e identificadas em sua totalidade como bastonetes Gram-positivos de acordo com a coloração tintorial da parede celular.

SILVA et al. (2016) no solo de Caatinga identificaram 13 cepas como bactérias Gram positivas das 17 cepas totais que foram coletadas no solo de Caatinga, em Fortaleza, no Ceará. Enquanto que CATTER et al., (2007) encontraram na coleta de solo nos manguezais do Rio Coco e do Riacho das Guaribas, CE uma presença majoritária de bactérias Gram-negativas e identificadas como actinobactérias.

Figura 5. Estruturas das bactérias observadas em microscópio de lente de imersão. Após a Coloração de Gram



A: Bastonetes Gram Positivos do P1. B: Bastonetes Gram Positivos do P2.

Observou-se também que as colônias do P1 possuem maior variedade de cores que as do P2, predominantemente as brancas em ambos os pontos com 26% e 44%, respectivamente (Figura 6 e Figura 7).

Figura 6. Ilustração da pigmentação bacteriana a partir do crescimento ágar PCA inclinado.

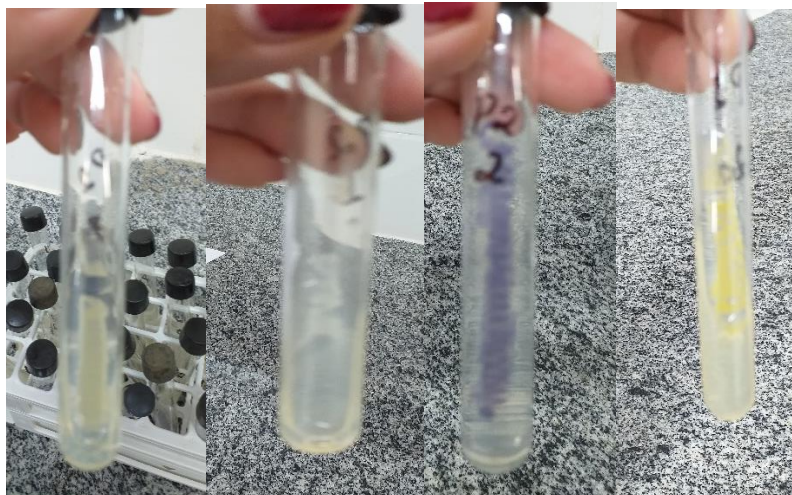
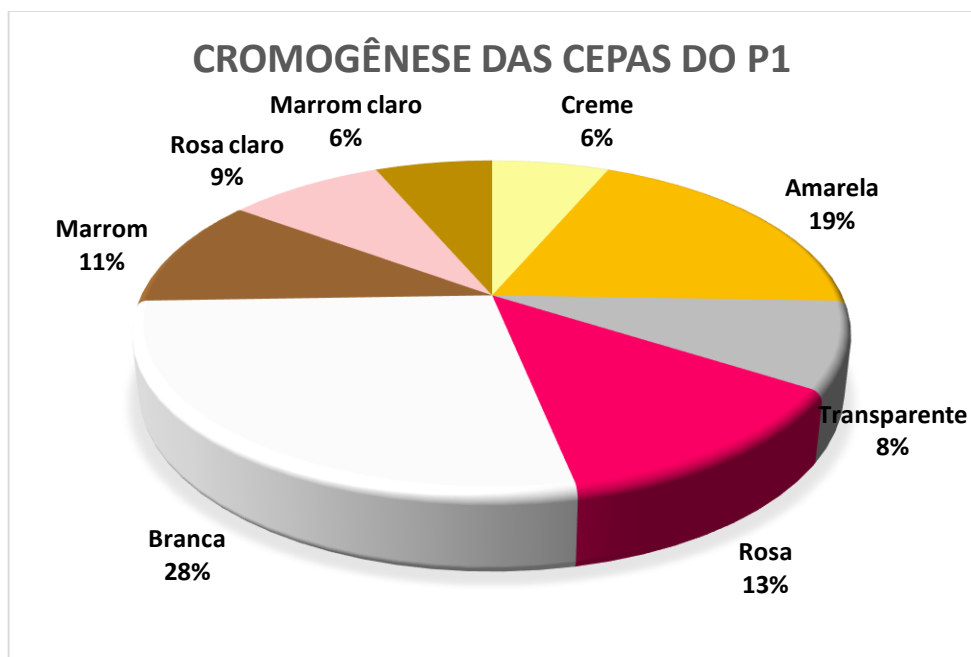
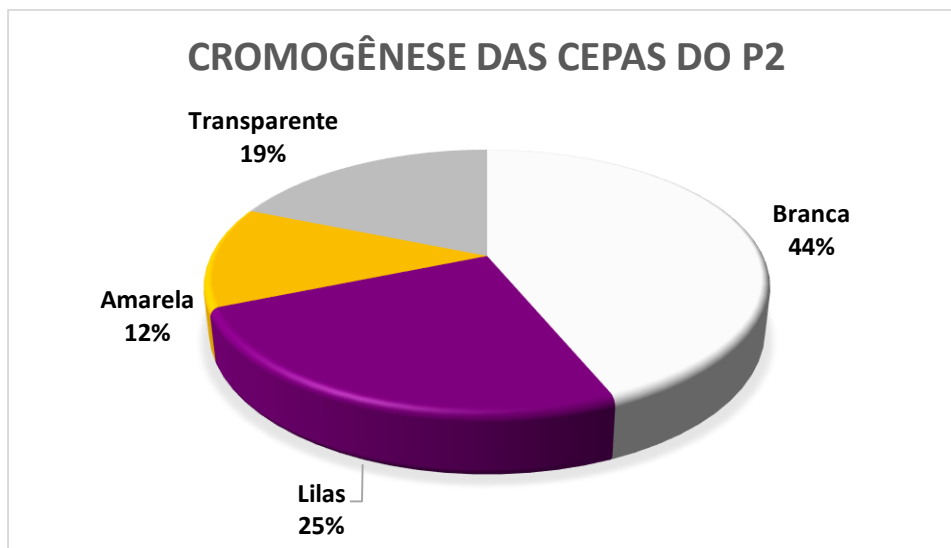


Figura 7. Porcentagem das cromogêneses das cepas dos pontos P1 e P2

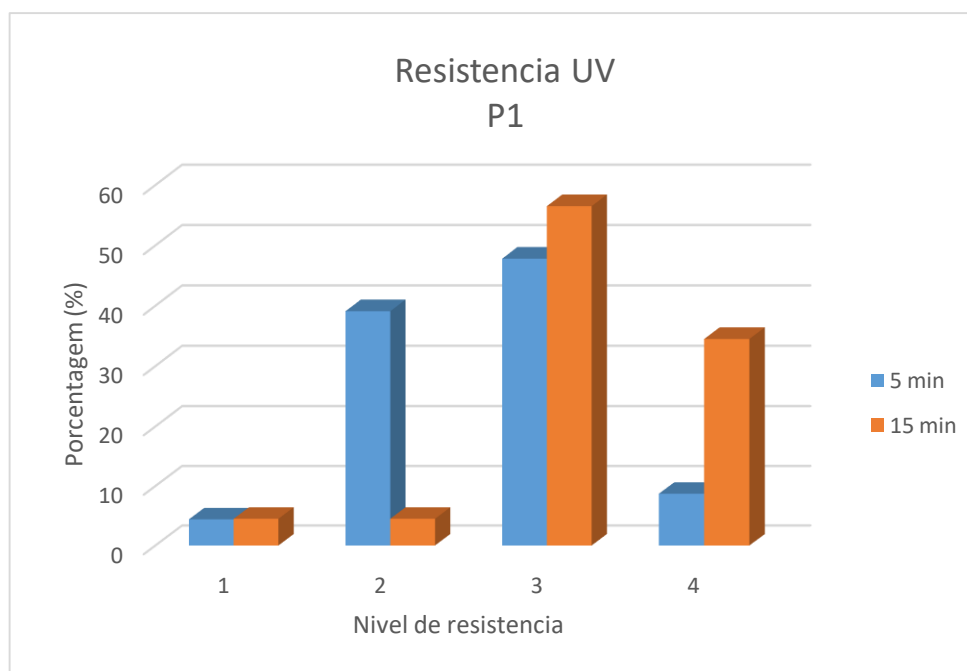




5.3 Teste de resistência UV

As cepas bacterianas foram expostas a radiação UV, durante um tempo de 5 e 15 minutos respectivamente. Após o decorrer do tempo, observou-se crescimento e resistência à luz ultravioleta na cabina de segurança. (Figura 8 e Figura 9).

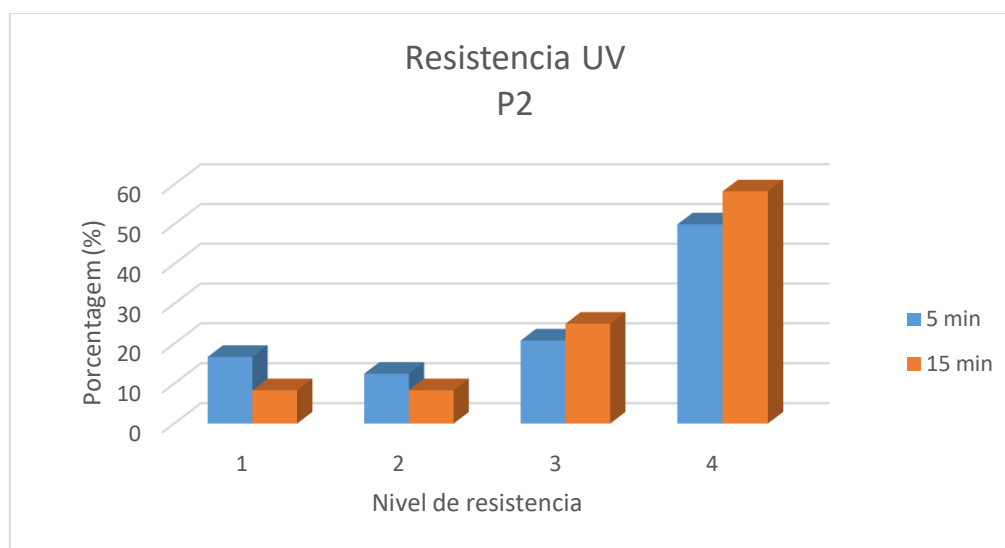
Figura 8. Resistencia das bactérias de P1 expostas a radiação UV durante 5 e 15 min



Nível de resistência na área exposta a UV: 1= amplo crescimento; 2=mediano crescimento; 3=pouco crescimento; 4=sem crescimento.

Em comparação com SILVA et al. 2016, das 23 cepas do P1 expostas à radiação UV, 21 cepas (91,3%) resistiram e 2 cepas (8,7%) não resistiram os 5 minutos. Entre as cepas que resistiram, 1 (4,4%) apresentou ampla resistência mostrando maior crescimento na área exposta da placa, 9 (39,1%) apresentaram crescimento moderado, 11 (47,8%) apresentaram pouco crescimento. Para os 15 minutos, 15 cepas (65,5%) resistiram, 1 (4,5%) apresentou ampla resistência, 1 (4,5%) apresentou crescimento moderado, 13 (56,5%) apresentaram pouco crescimento e 8 cepas (34,5%) não apresentaram crescimento.

Figura 9. Resistencia das bactérias de P2 expostas a radiação UV durante 5 e 15 min.



Nível de resistência na área exposta a UV: 1= amplo crescimento; 2=mediano crescimento; 3=pouco crescimento; 4=sem crescimento.

Do mesmo modo das 24 cepas do ponto P2 expostas, 12 cepas (50%) resistiram à radiação UV por 5 minutos, das quais 4 (16,7%) apresentaram amplo crescimento, 3 (12,5%) apresentaram mediano crescimento, 5 (20,8%) apresentaram pouco crescimento e 12 cepas (50%) não resistiram à radiação UV. Para o tempo de 15 minutos 10 cepas (41,7%) deram resultados positivos, 2 (8,35%) com amplo crescimento, 2 (8,35%) crescimento moderado, 6(25%) pouco crescimento e 14 cepas (58,3%) não apresentaram crescimento.

As cepas dos pontos P1 e P2 que tiveram melhor resistência durante os 15 minutos a radiação UV foram selecionadas para os testes de hidrocarbonetos. Tabela 3.

Tabela 3. Crescimento das cepas escolhidas

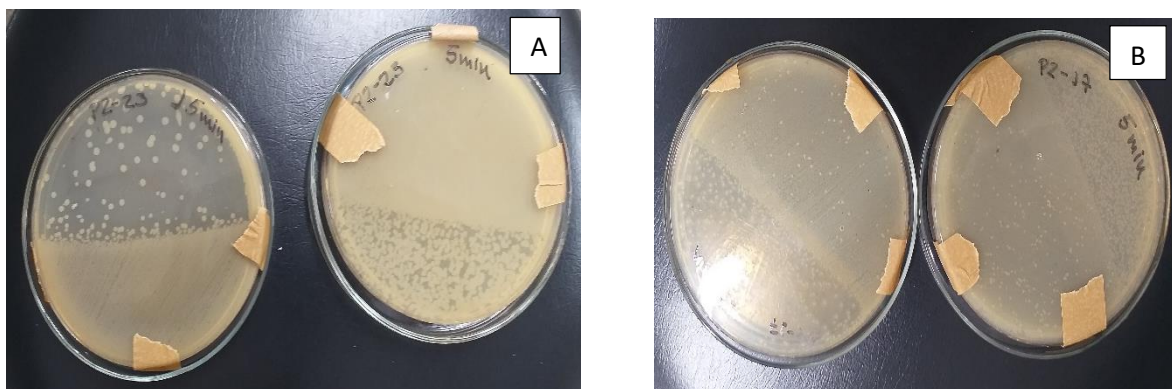
CEPA	5 min	15 min
P1- 9	++	+
P1 - 12	+++	+++
P1 - 17	++	+
P1 - 21	++	+
P2 - 17	+++	+++
P2 - 23	+++	+++
P2 - 24	++	+
P2 - 31	++	+

Crescimento: (+++) = amplo crescimento microbiano; (++) = mediano crescimento microbiano; (+) = pouco crescimento microbiano; (-) = sem crescimento microbiano

Segundo SILVA (2016) as cepas que apresentam características esporogênicas como as cepas P2-17 e P2-23 que apresentaram amplo crescimento microbiano a exposição a radiação ultravioleta até 15 minutos, são mais resistentes a exposição solar, o que pode sugerir o resultado.

Quando um microrganismo é exposto à radiação ultravioleta, o aparelho fotossintético é imediatamente protegido dos danos que podem ser causados pelo estresse oxidativo por pigmentos que funcionam como fotoprotetor (MELLO et al.,2011).

Figura 10. Resultados do teste de exposição a radiação ultravioleta das cepas P2-17 e P2-23.



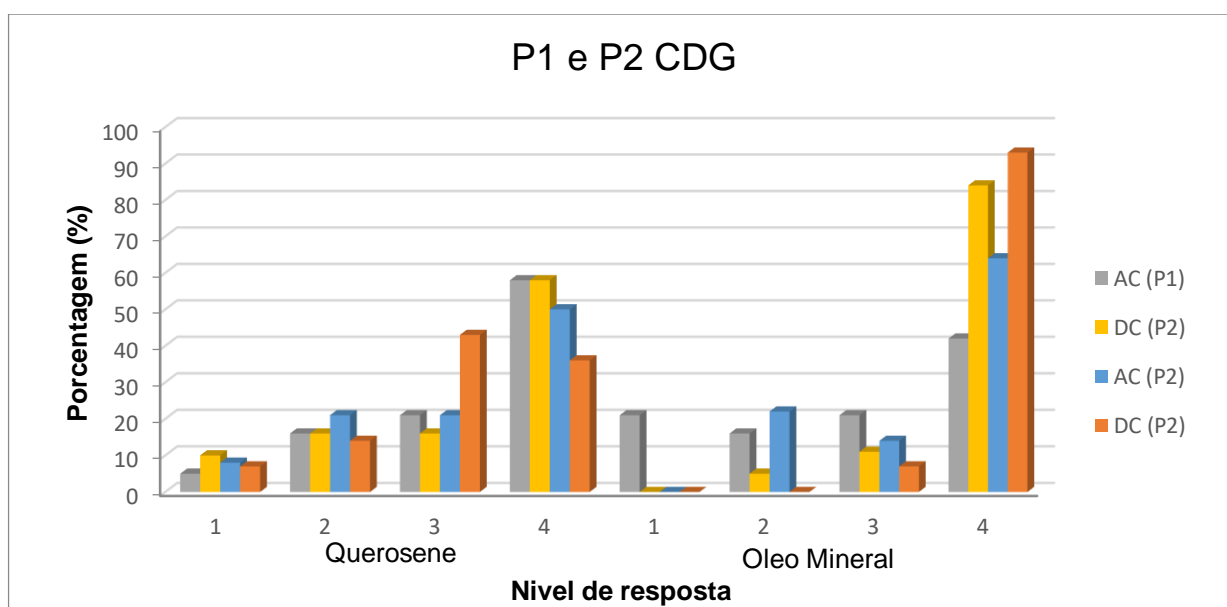
A: Exposição a 5 e 15 min cepa P2-23. B: Exposição a 5 e 15 min P2-17

5.4 Produção de biossurfactantes e bioemulsificantes

a) Teste de colapso da gota

Foram testadas 19 cepas do ponto P1 e 14 cepas do ponto P2 no meio acrescentado com querosene e óleo mineral como fontes de carbono, os resultados do teste estão apresentados na Figura 11.

Figura 11. Colapso da gota do liquido metabólico das bactérias de P1 e P2 em querosene e óleo mineral.



Nível de atividade: 1= Forte atividade; 2 = mediana atividade; 3= Fraca atividade; 4= Nenhuma atividade.

Das 19 cepas testadas do ponto P1 e 14 cepas do P2 com querosene como fonte de carbono e antes da centrifugação, 1(5%) cepa do P1 e 1(8%) cepa do P2 apresentaram forte atividade, 3(16%) cepas do P1 e 3(21%) cepas do P2 apresentaram mediana atividade, 4(21%) cepas do P1 e 3(21%) cepas do P2 apresentaram fraca atividade e 11(58%) cepas do P1 e 7(50%) cepas do P2 não apresentaram nenhuma atividade. Um 42% das cepas do P1 e a metade (50%) do P2 deram resultados positivos para o colapso da gota.

Depois da centrifugação foi separado o líquido metabólico (LM) e realizado o teste dando os seguintes resultados, 2(10%) cepas do P1 e 1(7%) cepa do P2 mostraram forte atividade, 3(16%) cepas do P1 e 2(14%) cepas do P2 mostraram mediana atividade, 3(16%) cepas do P1 e 6(43%) do P2 mostraram fraca atividade e 11(58%) cepas do P1 e 5(36%) cepas do P2 não mostraram nenhuma atividade. Com o líquido metabólico, 8 (42%) cepas de P1 e 9 (64%) de P2 apresentaram resultados positivos, mostrando um aumento de 14% no resultado positivo em P2. Ferreira et. al. (2017) isolaram 22 cepas bacterianas, dessas 10 cepas e 11 com líquido metabólico apresentaram resultado positivo no teste de colapso da gota com querosene como fonte de carbono.

Enquanto para o óleo mineral como fonte de carbono para o ponto P1 e P2 antes da centrifugação 4(21%) cepas do P1 apresentaram forte atividade, 3(16%) cepas do P1 e 3(22%) do P2 apresentaram moderada atividade, 4(21%) cepas do P1 e 2(14%) do P2 apresentaram fraca atividade e 8(42%) cepas do P1 e 9(64%) do P2 não apresentaram nenhuma atividade. Com o líquido metabólico, 1(5%) cepas do P1 apresentou moderada atividade, 2(11%) cepas do P1 e 1(7%) cepa do P2 apresentaram fraca atividade, 16(84%) do P1 e 13(93%) não apresentaram nenhuma atividade.

As cepas do P1 apresentam melhores resultados com o óleo mineral como fonte de carbono antes da centrifugação e melhores resultados com o querosene como fonte de carbono depois da centrifugação. As cepas do P2 apresentam melhores resultados com o querosene como fonte de carbono antes e depois da centrifugação.

As cepas P1-12 e P2-23 apresentaram forte atividade antes da centrifugação e nenhuma atividade do líquido metabólico depois da centrifuga. P1-9 e P1-31 apresentaram forte e moderada atividade com o líquido metabólico depois da centrifuga. A cepa P2-17 apresentou forte atividade antes e depois da centrifugação e as cepas P1-20, P1-27, P2-22, P2-28 e P2-32 apresentaram resultado negativo antes e depois da centrifugação nos dos meios. Segundo Satpute et al. (2010), os biossurfactantes podem permanecer aderidos as células das bactérias produtoras ou podem ser excretados no meio de cultivo.

b) Índice de Emulsificação

Os resultados referentes a determinação do Índice de Emulsificação para os pontos P1 e P2 estão expressos nas figuras 12 e 13.

Figura 12. . Índice de emulsificação das cepas do ponto P1 com querosene e óleo mineral.

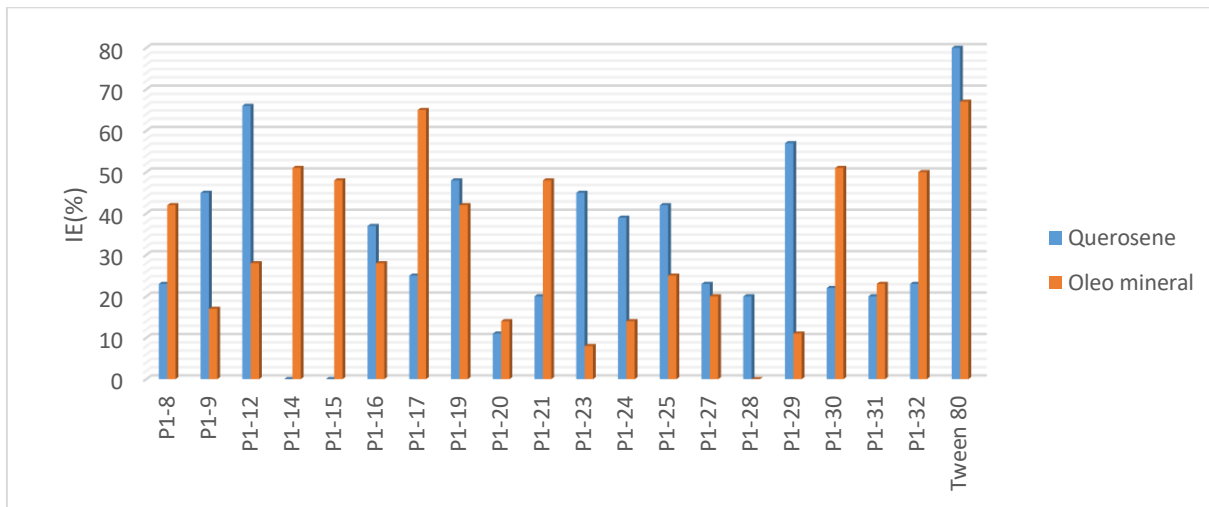
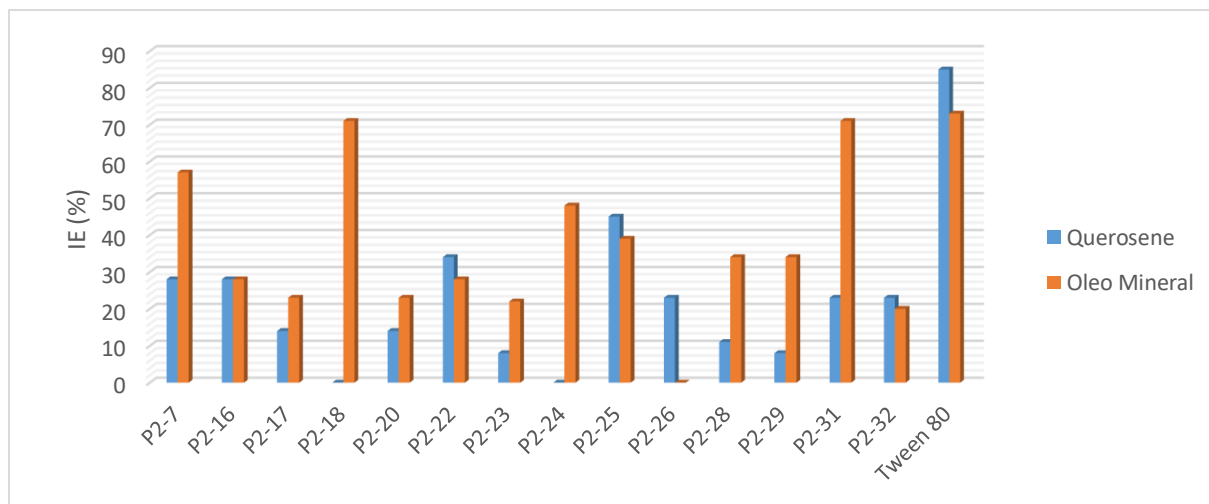


Figura 13. . Índice de emulsificação das cepas do ponto P2 com querosene e óleo mineral.



O índice de emulsificação foi determinado para todos os líquidos metabólicos extraídos dos pontos P1 e P2. No ponto P1, 6(32%) cepas com querosene apresentaram resultados acima do 40%, com máximo valor de 66% da cepa P1-12 e 8(42%) acrescidos

óleo mineral apresentaram resultados, com máximo valor de 65% da cepa P1-17 valor semelhante ao produzido pelo surfactante Tween 80(67%).

Para o ponto P2, 1(7%) cepa com querosene apresentou resultado acima do 40%, com o valor de 45% da cepa P2-25 e 4(29%) cepas com óleo mineral apresentaram índices maiores ao 40%, com máximo resultado de 71% da cepa P2-31 depois das 24 horas.

Em relação ao teste estatístico realizado, como o valor p foi 0,033, pode-se afirmar que não houve diferença significativa entre o querosene e o óleo mineral utilizados como compostos hidrofóbicos nas cepas do ponto P1, para as cepas do ponto P2 o valor de p foi 2,34 afirmando que houve diferença significativa entre o querosene e o óleo mineral na determinação do índice de emulsificação.

Com os testes do Colapso da gota e Índice de emulsificação foram escolhidas as cepas que apresentaram os melhores resultados para realizar os testes de atividade de emulsificação, estabilidade de emulsificação, Parafilm M e Dispersão do óleo.

c) Atividade de Emulsificação e Estabilidade de Emulsificação

Foram escolhidas 4 cepas de cada ponto P1 e P2 as quais apresentaram os melhores resultados, e utilizadas para atividade e estabilidade de emulsificação, os resultados estão na Tabela 4.

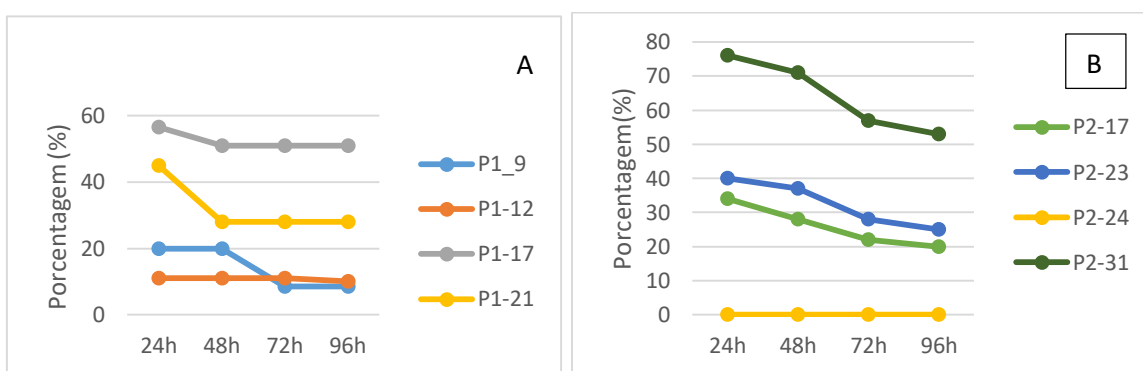
Tabela 4. Resultados da atividade e estabilidade de emulsificação

	Especie/ Genero	Atividade de Emulsificação (U.A.E)		Estabilidade de Emulsificação (%)	
		Querosene	OM	Querosene	OM
P1-9	ND	0,38 ± 0,06	0	64	23
P1-12	ND	2,76 ± 0,01	0	92	38
P1-17	ND	0	0,76 ± 0,05	40	79
P1-21	ND	0	0,11 ± 0,04	35	59
P2-17	<i>Bacillus sp.</i>	0	0	38	32
P2-23	<i>Bacillus sp.</i>	0	0	44	42
P2-24	<i>Bacillus sp.</i>	0	0,61 ± 0,04	S/E	57
P2-31	<i>Bacillus sp.</i>	0	1,78 ± 0,02	33	92
Tween 80		2.80	2.20 ± 0.35	78	88

ND = não definido

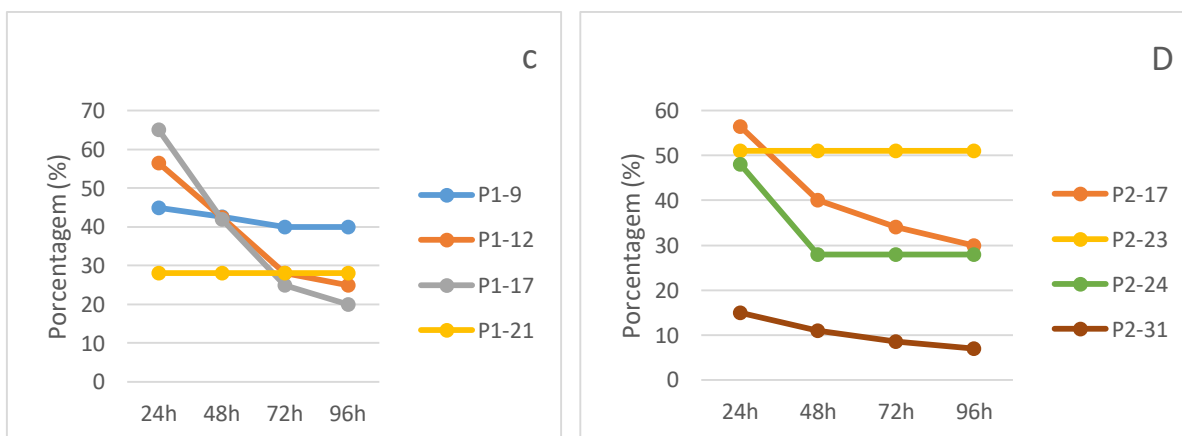
Os líquidos metabólicos produzidos com querosene que apresentaram melhor estabilidade de emulsificação foram P1-12 e P1-9, com valores maiores de 92% e 64%, e para os que foram produzidos com óleo mineral foram *Bacillus sp.* P2-31, *Bacillus sp.* P2-24, P1-17 e P1-21, com valores maiores de 92% e 79%. Segundo Willumsen e Karlson (1997), emulsões são consideradas estáveis quando conseguem manter mais de 50% da emulsão original após 24 horas de formadas.

Figura 14. Estabilidade de Emulsificação do P1 e P2 até 96 horas com querosene



A: Estabilidade das cepas de P1; B: Estabilidade das cepas de P2

Figura 15. Estabilidade de Emulsificação do P1 e P2 até 96 horas com óleo mineral



C: Estabilidade das cepas de P1; D: Estabilidade das cepas de P2

Das oito cepas escolhidas, o líquido metabólico com querosene P1;12 apresentou valor acima de 2,0 unidade de atividade emulsificante e *Bacillus sp.* P2-31 apresentou

valor acima da 1,0 unidade de atividade emulsificante (U.A.E.) e foram capazes de produzir emulsões de qualidade e com alta estabilidade de emulsificação. Os líquidos metabólicos das cepas P1-12, P1-17 e P2-31 apresentaram líquido metabólico com bons desempenhos nos testes do índice e estabilidade de emulsificação, porém não apresentaram atividade no teste do colapso da gota. Possivelmente, os biossurfactantes produzidos por essas cepas possuem alta massa molecular, típico dos bioemulsificantes (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011).

As cepas P2-17 e P2-23 apresentaram forte atividade no teste de colapso da gota, mas não apresentaram atividade emulsificante, de acordo com Bezerra (2012) os compostos produzidos por microrganismos podem atuar reduzindo a tensão superficial na interface ar-água, por tanto provavelmente estas cepas possuem propriedades tensoactivas, característica dos biossurfactantes.

d) Teste de Parafilm M e dispersão de óleo

Tabela 5. Resultados de teste Parafilm M, CDG e dispersão de óleo

	Parafilm M		Dispersão de óleo		Colapso da gota	
	Querosene	OM	Querosene	OM	Querosene	OM
P1-9	-	-	+	+	- + +	- - -
P1-12	-	-	-	+	- - -	- - -
P1-17	+	-	+	-	+ + -	- - -
P1-21	-	-	-	-	- - -	+ - -
P2-17	+++	-	++	++	+ + +	- - -
P2-23	-	+	++	+	- - +	- - -
P2-24	-	-	++	-	+ - -	- - -
P2-31	+	-	+	-	+ - +	- - -

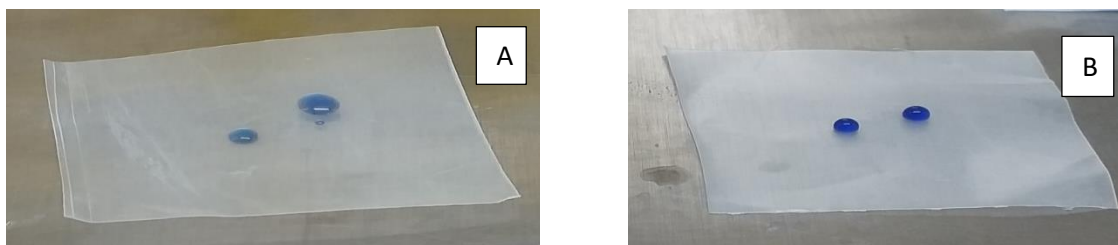
Parafilm M: (-) não altera sua forma; (+) a queda cai após 1 minuto; (++) a gota entra em colapso aos 30 segundos, (+++) a gota entra em colapso imediatamente. Teste de dispersão de óleo: (-) sem dispersão oleosa; (+) dispersão de óleo com um halo entre 0,5 cm e 0,9 cm; (++) dispersão de óleo com um halo entre 1 cm e 1,5 cm; (+++) dispersão de óleo com um halo entre 1,5 cm < X < 2,1 cm; (++++) dispersão de óleo com halo entre 2,1 < X < 3 cm.

O teste do parafilm M apresentou 3 (37,5%) cepas com resultado positivo, 4(50%) das cepas apresentam forte atividade do colapso da gota, e 3(37,5%) cepas apresentam bons resultados na dispersão de óleo com o querosene como fonte de carbono, como os

resultados são similares o querosene parece ser uma fonte eficiente na produção de biossurfactantes e bioemulsificantes.

Com o óleo mineral como fonte se obtiveram resultados negativos nos testes do colapso da gota e Parafilm M, com alguma atividade na dispersão de óleo, o que demonstra a presença de moléculas como agentes emulsificantes (RON e ROSENBERG, 1985). O resultado da dispersão de óleo tem uma tendência similar à os resultados do colapso da gota, de acordo com Youssef e col., (2004) existe uma alta correlação entre estes testes e indicam a presença de cepas medianamente produtoras de biossurfactantes.

Figura 16. Teste de Parafilm M



A: Experimento com resultado positivo; B: experimento com resultado negativo

5.5 Teste de Antagonismo

No teste de antagonismo uma bactéria deve inibir o crescimento de outra, neste trabalho se deseja o resultado contrário, se apresentaram como positivos aqueles que deixaram crescer ou se aproximar as bactérias. Tabela 6.

Tabela 6. Resultados do teste de antagonismo

Cepas Centrais	P1-9	P1-12	P1-17	P1-21	P2-17	P2-23	P2-24	P2-31
P1-9	X	-	-	-	-	-	-	-
P1-12	-	X	-	-	-	-	-	-
P1-17	-	-	X	-	-	-	-	-
P1-21	-	-	-	X	-	-	-	-
P2-17	-	-	-	-	X	-	-	-
P2-23	-	-	-	-	-	X	-	-
P2-24	-	-	-	+	-	-	X	-
P2-31	-	-	+	-	-	-	+	X

X: cepas centrais

Das cepas centrais 6 apresentaram antagonismo com as outras devido ao poder de inibição das bactérias e 2 cepas P2-24 com P1-21 e P2-31 com P1-17 e P2-24 permitiram um crescimento perto delas, enquanto elas não se misturam, mas com ficam crescentes juntas. Foram utilizadas para repetir todos os testes de produção de biossurfactantes e bioemulsificantes.

Figura 17. Teste de Antagonismo das cepas



Resultados do teste de antagonismo cepas P1-9, P1-12, P1-17, P1-21, P2-17, P2-23, P2-24, P2-32.

5.6 Produção de Biossurfactantes e Bioemulsificantes no consorcio

Os resultados dos testes estão apresentados na tabela 7 e 8

Tabela 7. Resultados dos consórcios nos testes de índice, estabilidade e atividade de emulsificação

Consortio	Índice de Emulsificação		Estabilidade (%)		Atividade (U.A.E)	
	Querosene	Oleo Mineral	Querosene	Oleo Mineral	Querosene	Oleo Mineral
P2-24;P1-21	37	51	57	76	0,06	1,36
P2-31;P2-24	40	42	65	67	0,032	1,26
P2-31;P1-17	36	31	92	84	0	0

Tabela 8. Resultado dos consórcios nos testes de CDG, Parafilm M e dispersão de óleo.

Consortio	Colapso da Gota				Parafilm M		Dispersão de Oleo	
	Querosene AC DC		O M AC DC		Querosene	Oleo Mineral	Querosene	Oleo Mineral
P2-24;P1-21	--+	---	+-	+++	+	+	+	++
P2-31;P2-24	+++	+++	---	---	+++	-	+	+
P2-31;P1-17	+++	+++	---	---	-	-	+	+

O consorcio com as cepas P2-24; P1-21 e P2-31; P2-24 apresentaram melhores resultados em comparação aos resultados obtidos pelas bactérias separadamente, no índice de emulsificação, na estabilidade do emulsificante e na atividade de emulsificação com óleo mineral como fonte de carbono e manteve resultados semelhantes ou menores com o querosene como fonte de carbono. O consorcio P2-31, P2-24 apresentou melhor estabilidade de emulsificação e resposta positiva no teste de Parafilm M. Enquanto os resultados no colapso da gota e dispersão do óleo permaneceram os mesmos ou o aumento foi mínimo nas duas fontes de carbono. Segundo Techer (2011), muitas vezes um único microrganismo não tem a capacidade de degradar completamente um hidrocarboneto, produzindo metabólitos secundários, dentro de um consórcio, esses metabólitos são transformados em metabólitos mais simples por outra espécie melhorando a atividade biossurfactante e emulsificante.

O consorcio P2-31; P1-17 apresentou resultados negativos e não conseguiu melhorar os resultados obtidos pelas bactérias, possivelmente um consórcio preparado em laboratório, o inconveniente é que elas coexistem harmoniosamente e que ambas as bactérias estão competindo pelo substrato e pelo espaço. (TIRADO, 2015).

6. CONCLUSÕES

- Foi possível o isolamento e verificação de atividade biossurfactante e bioemulsificante das cepas do solo de mangue.
- As oito cepas selecionadas, P1-9, P1-12, P1-17, P1-21, P2-17, P2-23, P2-24 e P2-31 apresentaram características de biossurfactantes e bioemulsificantes nos diferentes testes.
- Nem todas as cepas apresentaram comportamento de biossurfactante, além que as cepas que apresentaram comportamento emulsificante apresentaram alguma atividade biossurfactante.
- A cepa *Bacillus P2-17* apresentou bons resultados como biossurfactante em presença do querosene e alta resistência a radiação ultravioleta. A cepa *Bacillus sp. P2-31* apresentou boa atividade emulsificante e boa estabilidade em presença do óleo mineral
- Os consórcios melhoraram os resultados de três cepas aumentando a atividade biossurfactante.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados encontrados neste trabalho pode-se sugerir a realização de estudos complementares para comprovar outras atividades das cepas e seus líquidos metabolitos, como teste de toxicidade, realizar o teste antimicrobiano e o teste de atividade hemolítica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, A; ALVES,T; OLIVEIRA,N; LIMA,A; GOMES, M; PEREIRA,A; MADRUGA, M. Volatile profile in goat coalho cheese supplement with probiotic lactic acid bacteria. **LWT- Food science and technology Journal**. v -76. P. 209-215, 2017.

ARIFUZZAMAN, M.; KHATUN, M.R.; RAHMAN, H. Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n.29, p. 4615-4619, 2010.

BRASIL. Ministério de Meio Ambiente. **Programa zoneamento ecológico-econômico: ZEE do baixo Parnaíba**. Relatório final. Brasília: MMA/SDS. p. 92. 2002.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R. S; BANAT I.M.; Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 1998, 50, 520.

CHAÎNEAU, C.H., YEPREMIAN, C., VIDALIE, J.F. Bioremediation of a Crude Oil-Polluted Soil: Biodegradation, Leaching and Toxicity Assessments. *Water, Air, & Soil Pollution* 144, 419–440 2003.

CIRIGLIANO, M.C., CARMAN, G.M. Isolation by a emulsifier from Candida lipolytica. **Applied Environmental Microbiology**. v.48, 4. P. 747 750, 1984.

DESAI, J.D, BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and molecular biology reviews**. Rev 61, 47-64. 1997

DESAI, J. D.; DESAI, A. J. Em Biosurfactants: production, properties, applications; Kosaric, N., ed.; Marcel Decker: New York, cap. 3. 1993

GAUTAM, K.K. E TYAGI, V.K. A Review of Microbial Surfactant. **J Oleo Sci.** 55(4), 155-166. 2006

GREEK, B. F. Sales of detergents growing despite recession. **Chem. Eng. News** 69:25–52. 1991.

GUDIÑA E. J., PEREIRA J. F., COSTA R., EVTUGUIN D.V., COUTINHO J. A., TEIXEIRA J. A. Y RODRIGUES L. R. Novel bioemulsifier produced by a Paenibacillus strain isolated from crude oil. **Microb Cell Fact.** 14(14):1-11. 2015.

HU, F., MAO, D., KENRY., JI, S., WU, W., DING, D., KONG, D. Metal organic framework assisted in vivo bacterial metabolic labeling and precise antibacterial therapy. **Advanced material Journal**. v – 30, 2018.

JUDICE, V; BAËTA, COELHO A. Modelo empresarial, gestão de inovação e investimentos de venture capital em empresas de biotecnologia no Brasil. **Revista de Administração Contemporânea**, v. 9, n. 1, p. 171-191, 2005.

KREUZER, H.; MASSEY, A. Engenharia genética e biotecnologia. Porto Alegre: **Artmed**, 2002.

MAKKAR R, ROCKNE K. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Toxicology and Chemistry**. V- 22, p. 2280-2292, 2009.

MANCUSO NICHOLS C, LARDIE`RE SD, BOWMAN JP, NICHOLS PD, GIBSON JOHN AE, GUÉZENNEC J. Chemical characterization of exopolysaccharides from Antarctic marine bacteria. **Microb Ecol**;49:578–89.2005c.

; MARCHANT R; BANAT I. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 558–565, 2012.

MARELLA, E; HOLKENBRINK, C; SIEWERS, V; BORODINA, I. Engineering microbial fatty acid metabolism for biofuels and biochemicals. **Current opinion in biotechnology journal**. v-50, p. 39-46. 2018.

MELLO, A.J. M.et al. Expressão de pigmentos e algas pardas (*Canistrocarpus cervicornis* e *Padina gymnospora*): uma abordagem quimioecológica, **Ecologia de Campo UFSC**, 2011.

MULLIGAN, Catherine N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183–198, 2005.

MNIF, I. GHRIBI, D.High molecular weight bioemulsifiers, main properties and potential environmental and biomedical applications. **World J Microbiol Biotechnol**. 31:691–706. (2015b).

NITSCHKE, M. PASTORE, G.M. Biosurfactants: properties and applications. *Quím. Nova*. v.25, n.5, pp.772-776, .2002.

ORTEGA, M. (2012). Modelización de un proceso de biorremediación de suelos contaminados con gasoil (**Tesis de Doctorado**). Universidad de Granada, España.

PACWA-PLOCINICZAK, M. et al. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **Internacional Journal of Molecular Sciences**., Switzerland, v. 12, n.1, p. 633-654, 2011.

PANILAITIS B, CASTRO GR, SOLAIMAN D, KAPLAN DL. Biosynthesis of emulsan biopolymers from agro-based feedstocks. **J Appl Microbiol** 102:531–537, 2007.

PERFUMO A., SMYTH T. J., MARCHANT R. Y BANAT I. M. (2010). Production and Roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in Accessing Hydrophobic Substrates. **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. School of Biomedical Sciences, University of Ulster, Coleraine, County Londonderry, Northern Ireland, UK. 2010.

PRAKASHAM, R. S.; KUMAR, B. SUDHEER. Bacterial Metabolism–Coupled Energetics. In: **Microbial Electrochemical Technology**. Elsevier, 2019. p. 227-260.

RODRIGUES, H. B. RUIVO, M. L. LÔLA, A. C. MELLO, I. F. MOURA, Q. L. VIANA, R. S. Variabilidade quantitativa de populações microbiana observada em solo de floresta tropical úmida, associada às condições microclimáticas. *Revista Brasileira de Meteorologia*, v. 26, n. 4; 2011

ROSENBERG E. Y RON, E.Z. High- and Low-molecular-mass Microbial Surfactants. **Appl Microbiol Biot.**52:154-162. (1999).

SATPUTE S.K., BHAWSAR B.D., DHAKEPHALKAR P.K. Y CHOPADE B.A. Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. **Indian J Mar Sci** 37: 243-250. 2008

SEKUROVA, O; SCHNEIDER, O; ZOTCHEV, S. Novel bioactive natural products from bactéria bioprospecting, genome mining and metabolic engineering. *Microbial Biotechnology Journal*, v-12. 2019.

SILVA, R. B. MOURA, Q. RODRIGUES, H. BARRETO, P. NUNES, H. RODRIGUES, R. SANTOS, S. RUIVO, M. L. Estudo das colônias de fungos e bactérias em solos de floresta tropical associada a variação das chuvas na região. In: XVI Congresso Brasileiro de Meteorologia, 2010. **Anais da Sociedade Brasileira de Meteorologia**, Belém, 2010. CD-ROM.

SINGH, S.K; SRIVASTAVA, R.K; JOHN,S. Assessment and remediation of soils contaminated with gasoline. **Enviromental Geotechniques Journal**, pp. 294-301. 2006

TORTORA, G.J. et al. 2005. **Microbiologia.**: Porto Alegre: Ed. Artmed, 8 eds., v. 28, p. 792-812.