

## IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA BACTERIANA AUTÓCTONE DE EFLUENTES PETROQUÍMICOS NO MUNICÍPIO DE FORTALEZA

Suianne Priscilla Passos BARBOSA (<sup>1\*</sup>); Marilia Cristina Campelo CAMINHA(<sup>2</sup>); Mabel Calina França PAZ (<sup>3</sup>)

(1) Tecnóloga em Gestão Ambiental/CEFET-CE – Mestranda em Engenharia Civil e Hidráulica, \*Rua Antonio Bento, 111, (85)32326277, e-mail: [suiannepriscilla@yahoo.com.br](mailto:suiannepriscilla@yahoo.com.br)

(2) Tecnóloga em Gestão Ambiental/CEFET-CE, e-mail: [liazinhacampelo@yahoo.com.br](mailto:liazinhacampelo@yahoo.com.br)

(3) Bióloga/Doutora em Microbiologia/Pesquisadora DCR/FUNCAP/CNPq- CEFET-CE, E-mail: [mabel@cefetce.br](mailto:mabel@cefetce.br)

### RESUMO

As atividades relacionadas à indústria petroquímica vêm trazendo grande preocupação devido à geração de efluentes com substâncias orgânicas e inorgânicas dissolvidas de composição extremamente variada. Este efluente provoca a poluição do ar, do solo e das águas, causando danos à saúde humana e riscos ao ecossistema. Desta forma a comunidade científica busca realizar pesquisas na área de biorremediação dos rejeitos petroquímicos através do emprego de microrganismos, possibilitando a retirada das substâncias recalcitrantes sem impactar o meio ambiente. O presente trabalho teve como objetivo o isolamento e a identificação bioquímica e morfofisiológica da população bacteriana autóctone encontrada em um efluente petroquímico, visando explorar seu potencial biodegradativo. A metodologia empregada baseou-se em coletas de amostras do efluente tratado e bruto de uma indústria petroquímica das quais se utilizou alíquotas de diluições seriadas, sendo estas espalhadas em Ágar nutriente, e posteriormente isoladas da microbiota autóctone pela técnica “pour plate” para a obtenção de colônias puras, e com isso procedeu-se à identificação morfofisiológica e bioquímica. Os resultados do isolamento da primeira coleta mostraram que as bactérias isoladas das amostras de efluente são bacilos Gram-positivos, identificados como pertencentes ao gênero *Corynebacterium sp.* Os microrganismos isolados do efluente bruto e da lagoa aeróbia na segunda coleta são cocos Gram-positivos e foram identificados como *Staphylococcus sp.* As bactérias isoladas do efluente final foram identificadas como do gênero *Bacillus sp.*

**Palavras-chave:** efluente petroquímico, identificação, bactérias.

## **1. INTRODUÇÃO**

A água é um dos recursos naturais indispensáveis para a existência dos seres vivos. Entretanto, as atividades antrópicas produzem uma grande quantidade e variedade de poluentes que, ao serem lançados nos corpos hídricos, podem causar sérios impactos ambientais.

No Brasil, o parque industrial instalado, pela sua grandiosidade, constitui fator de grande importância na economia brasileira. Em contrapartida, gera enormes volumes de efluentes, os quais, quando não corretamente tratados, podem causar sérios problemas de contaminação (HASSEMER e SENS, 2002; KUNZ et al., 2002).

Apesar das refinarias estarem cientes e atentas às suas responsabilidades com a comunidade, empregando uma variedade de processos para proteger o meio ambiente; o ar, a água e a terra podem ser contaminados pelas diversas operações utilizadas desde a prospecção até o refinamento do petróleo. Estas contaminações podem ser originárias das impurezas presentes na composição natural do petróleo, ou geradas no processamento do mesmo (REBHUN e GALIL, 1994, COSTA, 2003).

Grande parte das unidades de tratamento de efluentes petroquímicos são formadas por tratamento químico, físico-químico e biológico. A eficiência para adequar as águas residuárias às normas vigentes depende da concentração inicial e da toxicidade dos contaminantes presentes, tornando indispensável o desenvolvimento de novas técnicas adequadas às características do efluente.

A poluição ambiental por derivados de petróleo é um problema de escala mundial, pois a cada ano aumenta a quantidade de resíduos oleosos emitidos pelas indústrias. Com isso, cresce o estímulo aos estudos de aplicação de microrganismos no tratamento destes resíduos de forma que não altere a qualidade de vida da população, que está intrinsecamente ligada à qualidade ambiental (VANCE-HARROP et al., 2004; URUM et al., 2004).

A biorremediação é uma tecnologia aplicada na recuperação de áreas contaminadas por compostos tóxicos, através da otimização de processos de degradação por microrganismos nativos (ATLAS, 1993, MACEDO et al., 2004).

No contexto da sustentabilidade busca-se um tratamento biológico para efluentes de indústrias petroquímicas e refinarias de óleo, visando a retirada dos compostos recalcitrantes. Com esta finalidade, torna-se necessário o isolamento, a identificação e a caracterização de microrganismos do efluente petroquímico em estudo, tendo em vista o processo de adaptação às condições de estresse e a possibilidade de apresentar propriedades degradativas diferenciadas.

Este estudo teve como objetivo isolar, de efluentes petroquímicos, bactérias com características aeróbias e mesofílicas através da técnica “pour plate”; identificar bioquimicamente e morfofisiologicamente a população bacteriana autóctone isolada; e avaliar o potencial e a habilidade da população bacteriana aeróbia na produção de biossurfactantes.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Indústria Petroquímica**

É notável a importância do mercado do petróleo e da grandeza de sua indústria nos dias de hoje. Porém junto a toda essa estrutura, há também uma quantidade considerável de impactos ambientais gerados pela indústria petrolífera. Dentre esses impactos, estão os oriundos da emissão de efluentes (OLIVEIRA et al., 2006).

A poluição por matéria orgânica vem crescendo, principalmente após a 2ª Guerra Mundial, com a expansão acelerada da indústria petroquímica. Atualmente, os poluentes produzidos em refinarias de óleos são considerados causadores de grandes problemas ambientais, principalmente, os orgânicos, tais como: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e compostos organosulfurados, e entre os inorgânicos os metais pesados (BRAILE e CAVALCANTI, 1993).

Sabe-se que os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e derivados, como os organosulfurados, são tóxicos ao homem e aos animais, causando sérios problemas à saúde e promovendo a eutrofização dos corpos aquáticos (DRYSDALE et al., 1999).

Os processos de tratamento dos efluentes petroquímicos podem ser: físicos, químicos e biológicos. Os métodos físicos mais utilizados são flotação, separação por gravidade, adsorção e extração, correspondendo à retirada de material sólido do efluente final. Os métodos químicos mais comuns são neutralização, coagulação seguida de precipitação, oxidação e combustão (VAN HAANDEL e MARAIS, 1999).

## **2.2. Tratamento Biológico dos Efluentes Petroquímicos**

Em geral, nos métodos de tratamento biológico para efluentes industriais petroquímicos através de processos de bioabsorção e biodegradação, os resíduos são tratados através de uma rica população de microrganismos autóctones ou não, que sobrevivem às condições adversas (MINO et al., 1994).

O uso de microrganismos no tratamento biológico de águas contaminadas vem promovendo importantes mudanças nos processos tecnológicos de tratamentos como sorção, acumulação e remediação, pois se mostram excelentes nestas ações, possibilitando a retirada de substâncias consideradas tóxicas encontradas nos rejeitos de atividades industriais de petróleo (PAZ, 2005).

Para Kambourova et al. (2003), o tratamento biológico apresenta diversas vantagens, pois a mineralização promove a destruição permanente dos resíduos e elimina os riscos de futuras contaminações, aumentando o nível de aceitação pública. Além disto, os processos biológicos quando combinados a outros métodos, tais como físicos - altas temperaturas, químicos e surfactantes possibilitam o aumento da eficiência total do tratamento (FEITKENHAUER et al., 2003).

Como exemplo das potencialidades de microrganismos na degradação de compostos recalcitrantes, alguns trabalhos podem ser mencionados. Robles et al. (2000) afirmam que várias espécies de *Penicillium* degradam ligninas e outros compostos aromáticos e fenólicos. Paz (2005) tratou águas residuárias de indústrias petroquímicas com *Bacillus* e *Geobacillus* obtendo remoção do dibenzotiofeno (DBT), que é um organossulfurado de difícil degradação.

### **2.2.1. Biosurfactantes**

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais. A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente são sintetizados a partir de derivados de petróleo. Entretanto o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle de meio ambiente levaram à procura de surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

O aparecimento de bioemulsificantes ou compostos de superfície ativa no meio de cultura ou unido às paredes celulares é geralmente considerado um pré-requisito para as interações iniciais entre os hidrocarbonetos e a célula microbiana, porque reduzem a tensão interfacial entre o óleo e a fase aquosa, diminuindo o diâmetro médio das gotas de óleo e propiciando o aumento da área interfacial (HOMEL, 1990, MARCHI, 1998). Os biosurfactantes possuem a capacidade de emulsificar e dispersar os hidrocarbonetos em água, tornando-os disponíveis e com isso retirá-los do ambiente “naturalmente”, através de processos como mineralização e solubilização (CHUN et al., 2002; MARCHESI et al., 1994).

Diversos microrganismos são estudados na produção de agentes biosurfactantes; entre eles encontram-se bactérias como: *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*; entre as leveduras estão: *Candida lipolytica*, *Candida tropicalis*, *Torulopsis bombicola*, entre tantos outros capazes de produzir diferentes tipos de bioemulsificantes (DESAI e BANAT, 1997, HUA et al., 2003).

Os biosurfactantes apresentam vantagens como baixa toxicidade, biodegradabilidade, produção a partir de substratos renováveis, capacidade de modificação estrutural através da engenharia genética ou técnicas bioquímicas e estabilidade em valores extremos de pH e temperatura (FIECHTER, 1992 e PRUTHI e CAMEOTRA, 1997, MARCHI, 1998).

### **2.2.3. Características morfofisiológicas e bioquímicas**

Os critérios utilizados para classificar e determinar as espécies bacterianas são de três tipos: estudo morfológico das culturas e das células, estudo fisiológico e estudo das reações bioquímicas e enzimáticas (LARPENT e GOURGAUD, 1975).

Os microbiologistas usam técnicas de coloração para mostrar as várias estruturas dos microrganismos, para identificar suas estruturas internas e para ajudar a identificar e separar microrganismos similares. Tamanho,

forma e arranjo das células podem ser determinados por meio de vários tipos de microscópios e com diferentes métodos de coloração. Uma das mais importantes e amplamente utilizadas técnicas de coloração diferencial para bactérias é a coloração de Gram. As bactérias coradas pelo método de Gram são classificadas em dois grupos: as bactérias Gram-positivas, que retêm o corante cristal violeta e aparecem coradas em violeta-escuro; e as bactérias Gram-negativas, que perdem o cristal violeta quando tratadas com álcool. As bactérias Gram-negativas são coradas com o corante safranina e aparecem coradas em vermelho (PELCZAR et al., 1996).

A coloração de Gram também tem largo relacionamento com o estado fisiológico da célula. As culturas jovens respondem melhor à diferenciação tintorial. As culturas velhas de Gram-positivas podem se apresentar como Gram variável, pela perda da capacidade de retenção do corante (SOARES et al, 1987).

De primordial importância para a identificação das bactérias, é o estudo de seus caracteres bioquímicos, uma vez que é comum a ocorrência de culturas bacterianas similares em suas características morfológicas e culturais e diferentes em suas reações metabólicas. Através das chamadas provas bioquímicas, são detectadas ações referentes à capacidade que têm as bactérias de desdobrar certos substratos como (açúcares, proteínas e gorduras), dependendo das variações das enzimas vinculadas com o metabolismo de cada substrato (SOARES et al 1987).

As bactérias diferem nos carboidratos que podem utilizar e nos tipos e quantidades de ácidos mistos produzidos. Essas diferenças de atividade enzimática servem como uma das características importantes pelas quais se reconhecem as diferentes espécies (KONEMAN et al, 1993). Alguns microorganismos são capazes de degradar um ou vários açúcares e produzir gás e ácidos, outros, ácidos, mas não gás, e outros, ainda, são incapazes de utilizar os açúcares (LARPENT e GOURGAUD, 1975).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Amostragem**

Para o isolamento de bactérias autóctones, foram realizadas coletas mensais do efluente de uma indústria petroquímica. Foram recolhidas amostras de efluente tratado e bruto da UTDI (Unidade de Tratamento de Despejos Industriais), tendo como pontos coletados: efluente bruto (E.B.), lagoa aeróbia (L.A.) e efluente final (E.F.), no período compreendido entre Julho e Outubro de 2006.

#### **3.2. Isolamento das colônias**

Realizou-se o isolamento da microbiota bacteriana autóctone, através de alíquotas de diluições seriadas pela técnica “pour plate”, em Ágar Nutriente, objetivando a obtenção de colônias isoladas. Em seguida, as colônias foram submetidas à identificação morfofisiológica e bioquímica.

#### **3.3. Identificação dos isolados bacterianos**

As bactérias isoladas no Ágar Nutriente com 24 horas de incubação foram submetidas aos métodos clássicos de identificação, ou seja, a sua morfologia, fisiologia e bioquímica.

##### **3.3.1. Características morfofisiológicas e bioquímicas dos isolados**

Foram analisadas as seguintes características morfofisiológicas e bioquímicas das amostras estudadas: coloração de Gram, crescimento em concentrações de cloreto de sódio, hemólise, fermentação de açúcares, catalase e utilização de citrato.

##### **a. Estudo morfológico**

Existem inúmeras técnicas de coloração que auxiliam no estudo morfológico de células, possibilitando o conhecimento de características como: dimensão da bactéria, forma celular, arranjo das colônias, presença ou ausência de esporos e composição da parede celular. Neste trabalho foi utilizada a coloração de Gram.

##### **b. Estudo bioquímico**

###### *Fermentação de açúcares*

O teste foi realizado com uso de um meio básico, em tubos inclinados, suplementado de uma solução estéril a 1% de cada açúcar investigado (glicose, lactose, maltose e frutose), num volume total de 5 mL por tubo,

incubados por um período de 24 horas a 37°C. A reação foi considerada positiva quando ocorria acidificação do meio, e, por conseguinte, turbidez e alteração na coloração.

#### *TSI –Tríplice Açúcar e Ferro*

O meio de cultura TSI tem como indicador o vermelho de fenol que é amarelo em pH abaixo de 6.8. Visto que o pH do meio não inoculado está estabilizado em 7.4, a produção de quantidades relativamente pequenas de ácidos resulta em uma mudança visível de cor. Para o teste do TSI, utilizamos um meio desidratado, adquirido já pronto. A colônia em estudo foi tocada com a extremidade da alça com a qual, em seguida, atravessa-se a parte profunda do meio, fazem-se estrias na superfície inclinada com movimento em S. Os tubos inoculados foram colocados em estufa de a 35°C durante 24 horas.

#### *Utilização do Citrato*

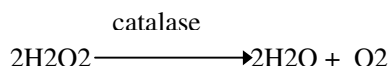
Foi determinado através da utilização do meio Citrato Simmons Ágar em tubos inclinados, incubados a 37°C por 24 horas. A reação positiva foi detectada pela mudança de cor do meio de verde para azul, onde se verifica a utilização do citrato como única fonte de carbono pelo microrganismo.

#### *Motilidade*

A motilidade foi verificada com uso do meio SIM em tubos pequenos, sendo as amostras inoculadas no centro da superfície do meio para verificação da formação do halo nessa superfície e que indica motilidade dos microrganismos, após incubação por 24 horas a 30°C.

#### *Produção da Catalase*

A catalase é uma enzima presente na maior parte das bactérias e atua na reação de hidrólise do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio abaixo:



Foi executada utilizando uma suspensão bacteriana (2mL) com turbidez entre 0.8 – 1.0 (D.O600) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 20%(m/v), como reagente. A reação foi considerada positiva pela presença de bolhas, que indicam a liberação de O<sub>2</sub>.

#### *Crescimento em diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl)*

Os microrganismos foram repicados para Caldo Nutritivo com diferentes concentrações de sal (2%,5%,7% e 10%) por um período de 72 horas a 37°C.

#### *Crescimento em diferentes temperaturas*

As bactérias em estudo foram repicadas para Caldo Nutritivo e foram incubadas em diferentes temperaturas (35°C, 40°C e 45°C) por um período de 48 horas. O crescimento foi considerado positivo quando ocorria turbidez na coloração do meio.

#### *Teste de hemólise*

A atividade hemolítica foi observada pelo crescimento das amostras em placas de Petri contendo Ágar sangue, incubadas a 37°C por 24 horas. A presença de halo ao redor da colônia indicava reação positiva.

#### *Reação de Oxidase*

Este teste foi observado a partir de tiras para a reação da oxidase da marca LABORCLIN LTDA.

### **3.3 Índice e Atividade de Emulsificação**

#### *Microrganismo*

*Corynebacterium* sp. isolada de efluente de indústria petroquímica, encontra-se no Laboratório Integrado de Águas de Mananciais e Residuárias (LIAMAR) no Centro Federal de Educação Tecnológica do Ceará (CEFETCE), mantida em ágar nutriente a 4°C.

#### *Condições de cultivo*

*Corynebacterium* sp. foi cultivada em caldo nutritivo (CN) e em caldo mineral (CM) distribuídos em 150 mL de caldo em frascos de Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, incubados estaticamente durante 24 horas

em estufa a 35°C que serviram de pré-inóculo. No dia seguinte, 1mL do pré-inóculo foi transferido para frascos de Erlenmeyer com capacidade de 250 mL contendo 150 mL de caldo nutritivo e caldo mineral. Os frascos foram incubados em meio estático por 24 horas. Após o período de incubação, os frascos correspondentes, foram submetidos à centrifugação a 3000g por 15 minutos, visando a separação da biomassa do líquido metabólico, que foi utilizado para estimação da produção de biossurfactante por intermédio do índice e atividade de emulsificação.

#### *Índice de emulsificação*

O índice de emulsificação foi determinado pelo método descrito segundo Cooper e Paddock (1984), utilizando 2 mL do líquido metabólico e 1 mL de n-hexadecano, homogeneizado em vórtex por 2 minutos, a 25° C. Após 2 minutos a leitura foi realizada através de medição da altura da emulsão formada. O índice foi calculado através da equação: índice da emulsão (%) =  $H_e \times 100 / H_t$ , onde  $H_e$  = altura da emulsão;  $H_t$  = altura total do líquido.

#### *Atividade de emulsificação*

A atividade de emulsificação foi determinada segundo o método de Cirigliano e Carman (1984), utilizando 2 mL do líquido metabólico, livre de células, e adicionando 2 mL de tampão acetato de sódio 0,1M (pH 3,0) e 1 mL de n-hexadecano. A mistura foi agitada em vórtex por 2 minutos, seguido de repouso por 10 min, leitura em espectrofotômetro a 540 nm. O resultado foi expresso em Unidade de Atividade de Emulsificação (U. A. E), que corresponde à leitura da absorbância multiplicada pela diluição.

## 4. ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS

### 4.1. Identificação das bactérias isoladas dos efluentes da primeira coleta

#### Estudo Morfofisiológico

As bactérias isoladas do EB, LA e EF apresentaram semelhantes características morfológicas. Todas as colônias da primeira coleta apresentaram colônias com consistência cremosa, bastante muco e coloração bege e quando coradas apresentaram-se como cocobacilos Gram-positivos.

#### Estudo das Características Bioquímicas

Os microrganismos em estudo fermentam a maioria dos carboidratos utilizados no teste, com exceção da bactéria isolada da lagoa aeróbia que não fermentou a maltose (Tabela 1). Os isolados do efluente bruto e do efluente final apresentaram motilidade positiva e o isolado da lagoa aeróbia apresentou motilidade negativa (Figura 1 e Tabela 1). Somente a bactéria isolada do efluente bruto conseguiu utilizar o Citrato de Simmons como fonte de carbono (Figura 2 e Tabela 1). A bactéria isolada de EB, LA e EF produziu gás no teste do TSI e no caldo BHI (Figura 3 e Tabela 1).

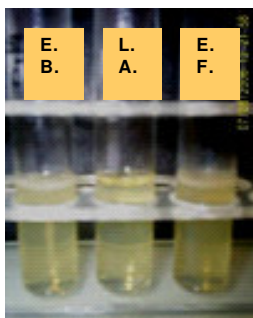


FIGURA 1: Teste de motilidade.

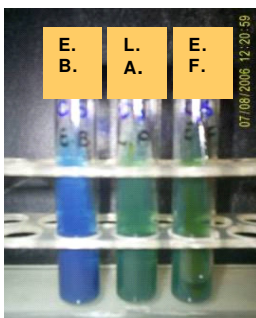


FIGURA 2: Prova do Citrato de Simmons.



FIGURA 3: TSI com produção de gás e fermentação dos açúcares.

Todos os isolados produziram a enzima catalase, que é responsável pela reação de hidrólise do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Tabela 1), cresceram satisfatoriamente em caldo nutritivo com concentrações de cloreto de sódio de 2%, 5% e 7% de NaCl e não apresentou crescimento em caldo nutritivo com concentração de NaCl de 10% (Tabela 2). Para crescimento em diferentes temperaturas, observou-se crescimento bacteriano nas temperaturas de 35°C e 40°C, entretanto nas temperaturas

superiores a 45°C, não se observou crescimento (Tabela 3). Em meio Ágar Sangue verificou-se o crescimento bacteriano sem a formação de halos, indicando que a bactéria é não hemolítica, pois não conseguiu provocar lise das hemácias (Tabela 1).

Os resultados mostraram que as bactérias são Gram-positivas, pertencem ao grupo dos bacilos Gram-positivos aeróbios. Em meio Ágar Sangue não foi observada atividade hemolítica, confirmando que as bactérias isoladas do efluente petroquímico em estudo são do gênero *Corynebacterium*, que são considerados microrganismos oportunistas e não patogênicas ao homem, entretanto há espécies deste gênero, consideradas pela bacteriologia médica, extremamente patogênica ao homem e alguns animais, como a *C.diphtheriae* (KONEMAN et al, 1993).

TABELA 1: Características morfofisiológicas e bioquímicas das bactérias isoladas de EB, LA e EF da primeira coleta.

Bactérias	Características morfofisiológicas e bioquímicas									
	Fermentação de carboidratos				Gram	Mot	Cit	Cat	TSI	Hem
	Glicose	Lactose	Maltose	Frutose						
EB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LA	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
EF	+	+	+	+	+	+	-	+	+/	-

Legenda: Coloração de Gram (Gram); Citrato (Cit); Motilidade (Mot); Catalase (Cat); Tríplice Açúcar e Ferro (TSI) Hemólise (Hem)

TABELA 2: Crescimento em diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl).

Bactérias	Crescimento em cloreto de sódio (NaCl)			
	2%	5%	7%	10%
EB	+	+/	+/	-
LA	+	+	+	-
EF	+	+/	+	-

TABELA 3: Crescimento bacteriano em diferentes temperaturas (°C).

Bactérias	Crescimento bacteriano em diferentes temperaturas (°C)		
	35	40	45
EB	+	+	-
LA	+	+	-
EF	+	+	-

#### 4.2. Identificação das bactérias isoladas dos efluentes da segunda coleta

##### *Estudo Morfofisiológico*

As bactérias isoladas das amostras dos pontos EB, LA apresentaram semelhantes características morfológicas. Quando coradas apresentaram-se como cocos pequenos Gram-positivos (Tabela 4). Entretanto, as bactérias isoladas do EF, quando coradas apresentaram-se como bacilos bem definidos e Gram-positivos.

### Estudo das Características Bioquímicas

As bactérias isoladas das amostras EB, LA e EF fermentaram todos os carboidratos utilizados no teste (Tabela 4). Todos os isolados são móveis (Tabela 4) e não utilizaram o Citrato de Simmons como fonte de carbono (Tabela 4). Os isolados não produziram gás em meio TSI e nem acidificaram o meio, mostrando que não são capazes de utilizar os três açúcares na presença do íon ferro (Tabela 4) e possuem habilidade de produzir a enzima catalase, que é responsável pela reação de hidrólise do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Tabela 4).

Em meio Ágar Sangue verificou-se o crescimento bacteriano sem a formação de halos para os isolados de EB e LA (Tabela 4), indicando que a bactéria é não hemolítica e para os isolados de EF verificou-se a formação de halos, indicando que a bactéria é hemolítica, provavelmente  $\alpha$ -hemolítica pelo tipo de colônia e coloração destas, segundo Koneman et al, 1993 (Tabela 4).

TABELA 4: Características morfofisiológicas e bioquímicas das bactérias isoladas de EB, LA e EF da segunda coleta.

Bactérias	Características morfofisiológicas e bioquímicas									
	Fermentação de carboidratos				Gram	Mot	Cit	Cat	TSI	Hem
	Glicose	Lactose	Maltose	Frutose						
EB	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
LA	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
EF	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	-	+	-	+

Legenda: Coloração de Gram (Gram); Citrato (Cit); Motilidade (Mot); Catalase (Cat); Tríplice Açúcar e Ferro (TSI) Hemólise (Hem).

Os resultados mostraram que os microrganismos isolados de EB e LA na segunda coleta são cocos pequenos Gram-positivos e a partir do teste positivo da catalase identificou-se como sendo da família Micrococcaceae e são do gênero *Staphylococcus* sp., por ter apresentado reação negativa de oxidase, o que difere do outro gênero desta mesma família, além do que utilizou o manitol como fonte de carbono. A bactéria isolada de EF, a partir da morfologia e dos testes bioquímicos, foi identificada como sendo da família Bacillaceae, gênero *Bacillus* sp.

### 4.3. Valores médios de Índice e Atividade de Emulsificação da amostra *Corynebacterium* sp.

TABELA 5: Índice e Atividade de Emulsificação da amostra *Corynebacterium* sp.

Condição	Índice de Emulsificação (%)		Atividade de emulsificação U.A. E <sub>(540nm)</sub>
	T <sub>0</sub>	T <sub>24</sub>	
Inoculo - CM	24,69	20,00	0,3330
Inoculo - CN	24,34	22,35	0,8589
Líquido metabólico – 12h - CM	25,65	24,00	0,3049
Líquido metabólico – 12h - CN	26,25	24,66	1,9591
Líquido metabólico-24h - CM	21,79	18,75	0,2736
Líquido metabólico-24h - CN	27,50	23,68	0,6082

Legenda: Caldo nutritivo (CN); caldo mineral (CM).



Os resultados da produção de biossurfactantes pela cepa *Corynebacterium* sp., isolada na primeira coleta, foram estudados em meio mineral – Bushnell Haas (CM) e em Caldo Nutritivo (CN), com o fim de observar o melhor desempenho em termos de crescimento celular e produção de surfactante, onde se realizou teste quantitativo e qualitativo com líquido metabólico livre de células. As análises qualitativas de emulsificação, pela atividade de emulsificação a 540 nm (CIRIGLIANO e CARMAN, 1984) mostraram que os melhores resultados foram obtidos no caldo nutritivo, onde havia nutrientes disponíveis e suficientes para sua produção (Tabela 5). Segundo Yakimov et al. (1995); Makkar e Cameotra (1998), os biossurfactantes são produtos metabólicos de alguns nutrientes, tais como hidrocarbonetos, carboidratos entre outros.

Nas últimas décadas, diversos microrganismos têm sido relatados como produtores de vários tipos de surfactantes. Os resultados do índice de emulsificação (teste quantitativo) nos mostraram que a cepa em estudo teve condições de produzir o biopolímero em condições de cultivo sem fonte de carbono, pois no meio mineral não havia uma fonte de carbono alternativa, que pudesse ser metabolizada pelo microrganismo em seu crescimento. Entretanto, nos resultados quantitativos, a cepa de *Corynebacterium* sp, em caldo nutritivo, onde havia nutrientes como a peptona e o extrato de carne, influenciaram diretamente na produção do biossurfactante (Tabela 5), evidenciando a importância de uma fonte de carbono de fácil assimilação pelo microrganismo.

Segundo Makkar e Cameotra (1998), alguns microrganismos produzem biossurfactantes durante o crescimento sobre uma larga variedade de substratos, em condições diversas de mesofilia e termofilia.

Para o teste qualitativo de atividade de emulsificação, verificou-se que os melhores resultados foram detectados onde se obteve os melhores índices, mostrando que onde havia substratos mais ricos, como peptona e extrato de carne, que foram consumidos como fonte de energia alternativa, foi produzido o surfactante durante o crescimento de 18 horas de cultivo no seu metabolismo.

## 5. CONCLUSÃO

A pesquisa possibilitou o isolamento e a identificação de três gêneros de bactérias autóctones provenientes de efluente petroquímico em Fortaleza. Nas amostras de EB, LA e EF da primeira coleta, todos os isolados foram identificados como sendo *Corynebacterium* sp. Na segunda coleta foram identificados dois gêneros. Os isolados de EB e LA foram identificados como sendo *Staphylococcus* sp e de EF são do gênero *Bacillus* sp.

Quanto a produção de biosurfactante pelo gênero *Corynebacterium* sp, obteve-se resultados satisfatórios relativos a atividade e a estabilidade. No entanto tornam-se indispensáveis, como propostas de futuras pesquisas, estudos sobre a produção e a identificação dos biopolímeros provenientes destas bactérias.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATLAS, R.M. **World S.Microbiology Biotechnology**. p. 493-494. 1993.
- BRAILE, P.M.; CAVALCANTI, J.E.W. **A. Manual de Tratamento de Águas Residuárias Industriais**. CETESB. São Paulo. 764p. 1993.
- CHUN, C.L.; LEE, J-J.; PARK, J.W. Solubilization of PAH mixtures by three different anionic surfactants. **Environmental Pollution**, vol.118, p.307-313.2002.
- CIRIGLIANO, M.C; CARMAN, G.M. (1984) Isolation of an emulsifier from a *Candida lipolytica*. **App.Environ. Microbiol.**, vol. 48, p.747-750. 1984.
- COOPER, D.G.; PADDOCK, D. A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **App.Environ. Microbiol.**, vol. 47, p 173-176. 1984.
- COSTA, C.A. **Pesquisa e Desenvolvimento de Nova Técnica para o tratamento de águas efluentes amoniacais**. XIX Prêmio Jovem Cientista. 2003.
- DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology: Reviews**, vol.61, p.47-64. 1997.
- DRYSDALE, E.G.; KASAN, A.; BUX, F. Denitrification by heterotrophic bacteria during activated sludge treatment. **Water Science and Technology**. 25: 03:357-361. 1999.

FEITKENHAUER, H.; MULLER, R.; MARKL, H. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 60°,70°C by *Thermus* and *Bacillus* spp. **Biodegradation**, vol.14, p.367-372. 2003.

HASSEMER, M.E.N.; SENZ, M.L. Tratamento do efluente de uma indústria têxtil. Processo físico-químico com ozônio e coagulação/floculação **Engenharia Sanitária e Ambiental**, vol. 7, p. 30-36, 2002.

HUA, Z.; CHEN, J.; LUN, S.; WANG, X. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. **Water Research**, vol.37. p.4143-4150. 2003.

KAMBOUROVA, M.; KIRILOVA, N.; MANDEVA, R.; DEREKOVA, A. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus*. MC7.**Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol.22, p.307-313. 2003.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWELL JUNIOR, V. R.; SOMMER, H. M. **Diagnóstico Microbiológico**. 2º ed. São Paulo. Editora Panamerica. 1993.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; *et al.* Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, 25, 78-82, 2002.

LARPENT, J. P.; GOURGAUD, M.L. **Microbiologia Prática**. São Paulo. Ed. da Universidade de São Paulo, 1975.

MACEDO, R.C.; RIZZO, A. C. L.; MILLIOLI, V. S. Uso de Biosurfactantes no tratamento em bioreator de solo contaminado. **Boletim Técnico PETROBRÁS**. 2004.

MARCHESI, J.R.; WHITE, G.F.; HOUSE, W.A.; RUSSELL, N.J. Bacterial cell hydrophobicity id modified during the biodegradation of anionic surfactants. FEMS. **Microbiology Letters**, vol.124, p.387-392.1994.

MINO, T.; SATOH, H.; MATSUO, T. Metabolism of different bacterial populations in enhanced biological removal processes. **Water Science and Technology**, vol.29, nº07. p.67-70. 1994.

NITSCHKE, M; PASTORE G.M. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**. Campinas-SP. Vol 25, nº 5, p. 772-776. 2002.

OLIVEIRA, E.C.; FÈLIX, J.P.L.; LEITÃO, R.C.; SANTAELLA, S.T. Degradação de fenóis por leveduras presentes em águas residuárias de refinarias de petróleo. **Gestão e tratamento de resíduos líquidos gerados na cadeia produtiva do petróleo**. Recife. Ed. Universitária da UFPE, 2006.

PAZ, M. C. F. **Identificação e Caracterização de *Bacillus licheniformis* e *Geobacillus stearothermophilus*. Produção de Biossurfactante e degradação de dibenzotiofeno (DBT) – por uma nova amostra de *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE. 2005.

PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Vol. 1. 2ª ed. São Paulo. MAKSON Books, 1996.

REBHUN, M., GALIL, N. **Water Science and Technology**. v.29, n.9, p. 133-131, 1994.

ROBLES, A.; LUCAS. R.; FUEGOS, G. A. de; GÁLVEZ, A. Biomass production and detoxification of wastewater from the olive oil industry by strains of *Penicillium* isolated from wastewater disposal ponds. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 217-221.2000.

SOARES, J.B.; CASIMIRO, A.R.C; ALBUQUERQUE, L.M.B. **Microbiologia Básica**. Fortaleza. Edições UFC. 1987.

URUM, K.; PEKDEMIR, T.; ÇOPUR, M. Surfactants treatment of crude contaminated soils. **Journal of Colloid and Interface Science**. vol.276, p.456-464. 2004.

VAN HAANDEL, A.C.; MARAIS, G. **O Comportamento de Sistemas de Lodo Ativado – Teorias e Aplicação para Projetos e Operações**. Cap: 4: 182. EPGRAF/ UFPB. Campina Grande – PB. 1999.

VANCE- HARROP, M.H. **Potencial biotecnológico de *Candida lipolytica* na produção de biossurfactantes, nos processos de remoção e bioabsorção do pireno (derivado do petróleo)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Micologia. Recife - PE. 2004.