

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA-PPGBIOTEC**

**SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS A
ISÓPTEROS (CUPINS), COLETADAS NO MUNICÍPIO DE COARI,
REGIÃO DO MÉDIO SOLIMÕES, COM POTENCIAL PARA
DEGRADAR PETRÓLEO**

ROZIVETE MACIEL DE LIMA

**Coari-AM
2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA-PPGBIOTEC**

**SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS A
ISÓPTEROS (CUPINS), COLETADAS NO MUNICÍPIO DE COARI,
REGIÃO DO MÉDIO SOLIMÕES, COM POTENCIAL PARA
DEGRADAR PETRÓLEO**

ROZIVETE MACIEL DE LIMA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. **EDMAR VAZ DE ANDRADE**
Co-orientador: Dr. **JOSEMAR GURGEL DA COSTA**

**Coari-AM
2017**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L732s Lima, Rozivete Maciel de
Seleção e identificação de bactérias associadas a isópteros (cupins), coletadas no município de Coari, região do Médio Solimões, com potencial para degradar petróleo / Rozivete Maciel de Lima. 2017
73 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Edmar Vaz de Andrade
Coorientador: Josemar Gurgel da Costa
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Petróleo. 2. Biorremediação. 3. Enterobacter cloacae. 4. Bioemulsificantes. 5. Biossurfactantes. I. Andrade, Edmar Vaz de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

ROZIVETE MACIEL DE LIMA

**SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS A
ISÓPTEROS (CUPINS), COLETADAS NO MUNICÍPIO DE COARI,
REGIÃO DO MÉDIO SOLIMÕES, COM POTENCIAL PARA
DEGRADAR PETRÓLEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em: 20 de dezembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade - Presidente

Prof^a. Dr^a. Waldirene Caldas Rocha
Instituto de Saúde e Biotecnologia-Campus Médio Solimões-Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. Dr^a. Márcia Neiva
Centro de Biotecnologia da Amazônia-CBA

Prof^a. Dr^a. Cecília Carvalho
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Kaminsk
Instituto de Saúde e Biotecnologia-Campus Médio Solimões-Universidade Federal do Amazonas

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente este trabalho à minha filha Lauanne Izabel de Lima Gonzalez, pelo amor, compreensão, paciência e parceria durante o transcorrer desta missão.

À minha mãe Edite Pereira Maciel pelo belo exemplo de vitória.

À minha irmã Rosicleia Pereira de Lima pelo incentivo e persistência à minha inscrição na seleção do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me concedido o dom da vida.

À Minha Família, Lauanne Izabel de Lima Gonzalez, Edite Pereira Maciel, Antônio Gonçalves de Lima, Rosicleia Pereira de Lima, entre outros, que sempre estiveram ao meu lado, apoiando a minha carreira científica.

Ao Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade, orientador, por sua orientação, paciência, dedicação e contribuição para conclusão deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Josemar Gurgel da Costa, co-orientador, pela infinita paciência e sabedoria, sem o qual esse trabalho certamente não teria sido concluído;

Ao Prof. Ms. Jefeson Antunes, pelo apoio, incentivo e colaboração;

Ao Prof. Ms. Júlio Nino Neto, pelo apoio e colaboração;

A Prof^a. Dr. Ana Cláudia Kaminsk, pela disponibilidade em nos ajudar na identificação dos térmitas;

Ao Prof. Dr. Márcio Couto, pelo apoio no transcorrer das etapas das análises estatísticas;

E a Instituição:

UFAM, pela oportunidade em cursar um programa de Pós-Graduação

LISTA DE FIGURAS

TÍTULO DA FIGURA	PÁGINA
Figura 1 - Divisão dos Hidrocarbonetos	17
Figura 2. Registros médio de acidentes ambientais entre os anos de 1970 a 2014 .	21
Figura 3. Transporte do petróleo da Província de Urucu até a cidade de Manaus....	23
Figura 4. Características morfológicas dos soldados ...	Erro! Indicador não definido.
Figura 5. Fluxograma das etapas desenvolvidas na pesquisa	39
Figura 6. Maceração dos térmitas	41
Figura 7. Protocolo experimental de obtenção de culturas puras.....	42
Figura 8. Identificação dos térmitas oriundos do cupinzeiro A2	50
Figura 9. Crescimento de A2H em meio líquido contendo petróleo como única fonte de carbono	55
Figura 10. Caracterização morfológica de A2H.....	55
Figura 11. Gel da PCR de A2H	56
Figura 12. Teste de sensibilidade a antibióticos de <i>E. cloacae</i>	58
Figura 13. Curva de crescimento de <i>E. cloacae</i>	59
Figura 14. Atividade Emulsificante de Sobrenadante de <i>E. cloacae</i>	61
Figura 15. Teste de atividade emulsificante de sobrenadante de cultura de <i>E. cloacae</i>	62
Figura 16. Hidrofobicidade Celular de <i>E. cloacae</i>	63
Figura 17. Produção de biossurfactante por <i>E. cloacae</i>	64

LISTA DE TABELAS

TÍTULO DA TABELA	PÁGINA
Tabela 1. Composição total de hidrocarbonetos do petróleo	18
Tabela 2. - Estruturas químicas e efeitos tóxicos dos 16 HPAs considerados poluentes prioritários pela USEPA	19
Tabela 3. Identificação dos pontos de coletas dos termiteiros	40
Tabela 4. Capacidade de crescimento microbiano em meio contendo petróleo como única fonte de carbono e energia	52
Tabela 5. Resultado do teste de enriquecimento dos morfotipos isolados do consórcio ConsA2	54
Tabela 6. Caracterização morfológica e identificação molecular de A2H.....	56
Tabela 7. Teste de sensibilidade a antibióticos de <i>E. cloacae</i>	58
Tabela 8. Resultados do teste Tukey para atividade emulsificante de sobrenadante de <i>E. cloacae</i>	61
Tabela 9. Resultados do teste Tukey de <i>E. cloace</i> referente a sua hidrofobicidade celular.....	63

LISTAS DE SIGLAS

BH-Bushnell Hass Broth

BTEXs- benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno

CFAOC- Capitania fluvial da Amazônia Ocidental

HPAs- Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

HTPs- Hidrocarbonetos totais do petróleo

ISB- Instituto de Saúde e Biotecnologia Campus Médio Solimões

ITOF- The International Tanker Owners Pollution Federation Limited (Federação Internacional dos proprietários de navios poluidores)

LB- Luria-Bertani

Min- minuto

MMM- Meio mineral mínimo

PCA- Ágar para contagem de placa

SDS- Dodecil sulfato de sódio

USEPA- Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

RESUMO

O petróleo também conhecido como óleo cru é um líquido escuro de composição variável, geralmente menos denso que a água. Constituindo uma mistura de grande número de diferentes compostos orgânicos e inorgânica, que por sua vez contribuem para torná-lo uma mistura complexa. Devido ao consumo cada vez crescente dos combustíveis fósseis coloca o petróleo como um dos mais importantes produtos de consumo da humanidade. Inegáveis avanços tecnológicos e até mesmo sociais são advindos da era “Pós-Petróleo”. Porém, a dependência da população por derivados do petróleo vem ocasionando aos diversos tipos de ecossistemas (terrestres e aquáticos) graves danos ambientais. Deste modo, a busca por alternativas que objetivem atenuar tais impactos vem crescendo significativamente e dentre elas se destaca a biorremediação. Esta técnica emprega organismos vivos, sobretudo microrganismos com o objetivo de degradar poluentes ambientais. Neste contexto, um estudo prévio isolou a bactéria *Enterobacter cloacae* provenientes de amostras de térmitas, coletadas na Estrada Coari-Itapeuá no Município de Coari, confirmou-se sua identificação por sequenciamento do gene 16S. Testes de biodegradação realizados em laboratório confirmaram a capacidade desta bactéria em degradar petróleo, além de confirmar a produção de biossurfactante e bioemulsificante por esta espécie. Ainda neste estudo, comprovou-se que a *E. cloacae* tem a capacidade de aumentar sua hidrofobicidade celular, quando exposta ao óleo bruto. Consequentemente, estes meios biológicos (produção de biossurfactante, bioemulsificante e aumento a hidrofobicidade celular) tem como objetivos aumentar o contato com solventes hidrofóbicos, como no caso do petróleo. O objetivo desta pesquisa foi selecionar e identificar bactérias associadas a isópteros coletadas da Região do Médio Solimões com potencial para degradar petróleo. Portanto, após a identificação molecular realizou-se testes para verificar seu perfil de crescimento em meio de cultura contendo petróleo como única fonte de carbono e energia, bem como testes de hidrofobicidade celular, produção de biossurfactantes e bioemulsificantes. Porém, mais estudos são necessário para efetiva comprovação do potencial deste microrganismo em degradar petróleo, afim de empregá-lo em técnicas de biorremediação.

Palavras-chaves: petróleo, biorremediação, *Enterobacter cloacae*, bioemulsificantes, biossurfactantes e hidrofobicidade celular.

ABSTRACT

Oil also known as crude oil is a dark liquid of variable composition, usually less dense than water. Composing a mixture of large number of different organic and inorganic compounds, which in turn contribute to make it a complex blend. Due to the increasing consumption of fossil fuels, petroleum is one of humanity's most important consumer products. Undeniable technological and even social advances come from the post-oil era. However, the dependence of the population on oil products has caused many types of ecosystems (terrestrial and aquatic) serious environmental damage. In this way, the search for alternatives that aim to mitigate these impacts has been growing significantly, among them the bioremediation. This technique uses living organisms, especially microorganisms with the objective of degrading environmental pollutants. In this context, a previous study isolated the *Enterobacter cloacae* bacteria from samples of termites, collected on the Coari-Itapeuá Road in the Municipality of Coari, its identification was confirmed by sequencing the 16S gene. Biodegradation tests carried out in the laboratory have confirmed the ability of this bacterium to degrade oil. The objective of this research was to select and identify bacteria associated with isoptera collected from the Middle Solimões Region with potential to degrade oil. After the identification, tests were carried out to verify its growth profile in oil culture medium as the only source of carbon and energy, as well as cell hydrophobicity tests, biosurfactant and bioemulsifier production. However, more studies are needed to effectively prove the potential of this microorganism to degrade oil, that is, to use it in bioremediation techniques.

Keywords: petroleum, bioremediation, *Enterobacter cloacae*, bioemulsifiers, biosurfactants and cellular hydrophobicity.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Petróleo: Propriedade, Aplicações e Problema Ambiental	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Petróleo	16
2.1.1 Hidrocarbonetos totais do petróleo	17
2.2 Impactos Ambientais Ocasionados por Petróleo e Derivados	20
2.2.1 Desastres ambientais acarretados por embarcações de pequeno e médio porte e potenciais risco de contaminação nos rios Amazônicos	22
2.3 Biorremediação e Biodegradação	24
2.3.1 Biodegradação de Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (HTPs) por Bactérias ou Consórcios Microbianos	26
2.3.2 Oxigenases	27
2.4 Térmitas: Conceito, Classificação, Morfologia, Biologia e Alimentação	28
2.4.1 Conceito	28
2.4.2 Classificação	28
2.4.3 Morfologia	30
2.4.4 Biologia	30
2.4.5 Alimentação	32
2.5 <i>Enterobacter cloacae</i>	33
2.6 Lignina: Estrutura e Complexidade	34
2.7 Produção de biossurfactantes e bioemulsificantes por bactérias degradadoras de petróleo e aplicabilidade destes compostos	35
3. OBJETIVO	37
3.1 Objetivo Geral	37
3.2 Objetivos Específicos	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Coleta e Identificação Taxonômica das Espécies de Isópteros	39
4.2 Preparação do Inóculo	40
4.3 Seleção de Bactérias que Utilizam Petróleo como Fonte de Carbono e Energia	41
4.4 Obtenção de Culturas Puras a partir do Consórcio Selecionado	41
4.5 Enriquecimento de Culturas dos Morfotipos Isolados	42
4.6 Caracterização Morfológica do Morfotipo Selecionado	43
4.7 Identificação Molecular por Sequenciamento do Gene para 16S rRNA	44
4.7.1 Extração de DNA Genômico	44

4.7.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do gene 16S rRNA	45
4.7.3 Sequenciamento da Região Gênica 16S rRNA	45
4.8 Teste de Sensibilidade a Antibióticos.....	46
4.9 Perfil de Crescimento Bacteriano	47
4.10 Atividade Emulsificante de Sobrenadante de Cultura Bacteriana	48
4.11 Teste de Hidrofobicidade Celular.....	48
4.12 Detectação de Produção de Biossurfactante	49
4.13 Tratamento Estatístico	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Identificação dos Isópteros	50
5.2 Seleção de Bactérias que Utilizam Petróleo como Fonte de Carbono e Energia	51
5.4 Enriquecimento de Culturas dos Morfotipos Isolados do Consórcio consA2....	53
5.5 Caracterização Morfológica e Identificação Molecular de A2H.....	55
5.6 Teste de Susceptibilidade a Antimicrobianos de <i>Enterobacter cloacae</i>	57
5.7 Perfil de Crescimento Bacteriano	59
5.8 Atividade Emulsificante de Sobrenadante de Cultura Bacteriana de <i>Enterobacter cloacae</i>	60
5.9 Hidrofobicidade Celular	62
5.10 Resultados do Teste de Produção de Biossurfactante	63
6. CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS	67
ANEXOS.....	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 Petróleo: Propriedade, Aplicações e Problema Ambiental

O petróleo também conhecido como óleo cru, óleo bruto, é o principal representante dos hidrocarbonetos (composto formado exclusivamente de carbono e hidrogênio). Ele se apresenta como um líquido escuro, viscoso, geralmente menos denso que a água, além de ser caracterizado como uma mistura bastante complexa que envolve mais de 600 tipos de hidrocarbonetos (ROCHA *et al.*, 2009).

Ele está no topo das substâncias que mais contaminam o planeta, tendo em vista seu consumo cada vez mais elevado. Porém, estudos afirmam que o petróleo tem duas grandes aplicações: a primeira é como fonte de combustíveis, a segunda como fonte de matérias-primas industriais. Deste modo, se o óleo bruto for submetido a destilação fracionada, ele dará origem a diversas frações orgânicas, com diferentes pesos moleculares e principalmente com diversas utilidades como: gás de cozinha, gasolina, querosene, óleo diesel, óleo lubrificante, vaselina, parafina, piche e etc. Portanto, é indiscutível sua importância financeira e econômica (BAIRD, 2002).

No entanto, a dependência da população por derivados do petróleo vem acarretando danos ao meio ambiente. Pesquisas relacionadas apontam que nos últimos 40 anos quase 6 milhões de toneladas de óleo cru ou derivados foram derramados nos ecossistemas marinhos, sem considerar os acidentes ocorridos em terra firme. Por se tratar de uma mistura oleosa, sua retirada do solo, bem como da água é uma tarefa extremamente complexa. Alguns compostos presentes no petróleo é de fácil remoção, sendo até voláteis, enquanto outros, são mais difíceis a sua retirada e persistem por bastante tempo no ambiente. Outro fator que merece abordagem é que certos componentes do petróleo (em especial os aromáticos) possuem efeito tóxico, carcinogênicos e mutagênicos, representando assim, risco aos diferentes tipos ecossistemas, bem como aos seres humanos (SISINNO, 2003).

1.2 Biorremediação

Métodos relacionados ao tratamento de áreas afetadas por petróleo estão sendo constantemente avaliados e testados. Uma técnica que vem se mostrando bastante promissora é a biorremediação. Ela emprega organismos vivos, sobretudo microrganismos, objetivando degradar poluentes ambientais. Há relatos na literatura de diversos microrganismos capazes de proverem a remediação de áreas

contaminadas por petróleo. Porém, especial atenção tem sido dada aos fungos filamentosos e as bactérias. Alguns gêneros de bactérias vem se destacando frente a este método, entre eles os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, ambos possuem espécies com reconhecida capacidade de remediar compostos de petróleo (HARITASH e KAUSHIK, 2009).

Portanto, visando contribuir com pesquisas voltadas à biorremediação de áreas impactadas por petróleo, o presente trabalho teve como objetivo selecionar e identificar bactérias associadas a isópteros, coletadas no Município de Coari-AM, Região do Médio Solimões, com potencial para degradar petróleo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Petróleo

O petróleo também conhecido como óleo cru é um líquido escuro de composição variável, geralmente menos denso que a água. Constitui-se de uma mistura de grande número de diferentes compostos orgânicos e inorgânicos, que por sua vez contribuem para torná-lo uma mistura complexa. Seu componente majoritário são os hidrocarbonetos, ou seja, aqueles formados de carbono e hidrogênio. Entretanto, uma pequena parte é constituída de compostos orgânicos contendo átomos de enxofre, nitrogênio e oxigênio, considerados impurezas (ROCHA *et al.*, 2009).

A formação do petróleo é similar à do carvão, ou seja, a matéria orgânica sofre transformações em condições anaeróbicas e elevadas pressões. Estudos revelam que o petróleo diferentemente do carvão é proveniente de matéria orgânica de origem animal. Segundo essa teoria, organismos de tamanhos microscópicos constituintes do plâncton são sedimentados no fundo dos mares em camadas superpostas, que em um ambiente sem oxigênio fica sujeito a ação de bactérias anaeróbicas. Carboidratos e proteínas são transformados, por essas bactérias, em substâncias gasosas solúveis em água e em um resíduo formado por gorduras e compostos estáveis lipossolúveis, como resinas, colesterol, etc., conhecido como sapropel. Esse resíduo é transformado em hidrocarbonetos líquidos e gasosos pela ação das bactérias após enormes períodos de tempo, associado à pressão e temperatura, bem como a catálise promovida pela argila, gerando assim aquilo que conhecemos como petróleo (ROCHA *et al.*, 2009).

Fundamentalmente, podemos afirmar que o petróleo tem duas grandes aplicações. A primeira é como fonte de combustíveis, a segunda como fonte de matérias-primas industriais, ou seja, são reagentes empregados em reações químicas, realizadas em indústrias adequadamente equipadas, permitindo assim, a obtenção de novas substâncias de interesse para a sociedade (BAIRD, 2002).

Se o petróleo for submetido a destilação fracionada, o óleo cru dará origem a diversas frações orgânicas, com diferentes pesos moleculares e principalmente com diversas utilidades como: gás de cozinha, gasolina, querosene, óleo diesel, óleo lubrificante, vaselina, parafina, piche e etc. Deste modo, é indiscutível sua importância financeira e econômica (ROCHA *et al.*, 2009).

2.1.1 Hidrocarbonetos totais do petróleo

Os hidrocarbonetos são basicamente divididos em dois grupos, os alifáticos e os aromáticos. Alifáticos são hidrocarbonetos com átomos de carbono estruturais em cadeias abertas e fechadas (cíclicas), não aromáticas. Já os aromáticos são hidrocarbonetos que apresentam em sua estrutura química anel benzênico (BARBOSA, 2004).

O chamado HTP (*Total Petroleum Hydrocarbons*) é o conjunto de todos os hidrocarbonetos que estão presentes em uma amostra de petróleo ou de seus derivados, considerando-se a soma dos compostos alifáticos e aromáticos (BARBOSA, 2004).

Os hidrocarbonetos alifáticos estão divididos em quatro classes: alcanos, alcenos, alcinos e cicloalcanos. Por sua vez, os aromáticos, estão divididos em monoaromáticos e poliaromáticos (Figura 1) (BARBOSA, 2004).

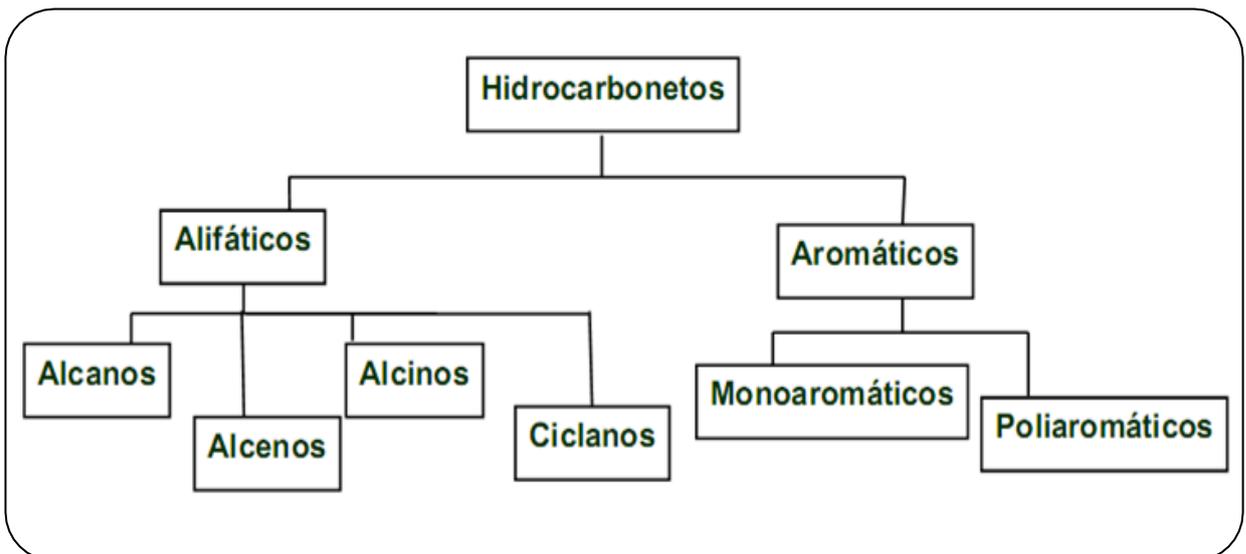


Figura 1 - Divisão dos Hidrocarbonetos

Fonte: Santos. F.J

As propriedades dos hidrocarbonetos variam de função da presença de instaurações e cadeias cíclicas, assim os hidrocarbonetos cujas ligações carbono-carbono são ligações simples, são chamados de alcanos, os que contêm uma ligação dupla entre os átomos de carbonos são os alquenos e aqueles que apresentam uma ligação tripla carbono-carbono são alquinos. Assim para critério de classificação temos: a presença de ligações duplas ou triplas e a existência de cadeias fechada (BARBOSA, 2004).

Os alcanos constituem a maior porção dos compostos presentes no petróleo (52%), em segundo lugar aparecem os hidrocarbonetos aromáticos (24%), seguidos

pelos compostos nitrogenados, oxigenados e sulfurados somam 16% de todos os compostos presentes e finalmente os asfaltenos, que somam 8%, estes formam a fração mais densa dos hidrocarbonetos de petróleo (Tabela 1) (HADIBARATA e TACHIBANA, 2009).

Tabela 1. Composição total de hidrocarbonetos do petróleo

Fração	Porcentagem (%)
Alcanos	52
Aromáticos	24
NSO*	16
Asfaleno	8

*Compostos Nitrogenados, Sulfurados e Oxigenados
Fonte: (Hadibarata e Tachibana, 2009)

Os hidrocarbonetos parafínicos, pertencentes à série dos alcanos, representam uma grande proporção dos hidrocarbonetos presentes no petróleo e no gás natural. São os maiores constituintes da matéria orgânica do solo, pouco reativos, insolúveis e recalcitrantes (PETER, 2004).

Os cíclicos são hidrocarbonetos que apresentam cadeia fechada entre átomos de carbono, como os cicloalcanos, representados por hidrocarbonetos naftênicos. Estes são compostos por cadeias fechadas em forma de anéis contendo três ou mais átomos de carbono, sendo que as séries com cinco ou seis átomos são mais comumente encontradas nos petróleos. As ligações saturadas das cadeias conferem estabilidade aos compostos, cujas propriedades se assemelham às dos alcanos lineares (BARBOSA, 2004).

Os hidrocarbonetos aromáticos assim como os alcanos, são introduzidos no ambiente a partir de várias fontes: os motores de exaustão a gasolina e especialmente os de combustão a diesel, o alcatrão da fumaça do cigarro, a superfície de alimentos chamuscados ou queimados, a fumaça da queima de madeira ou carvão, e outros processos de combustíveis nos quais o carbono ou combustíveis não são completamente convertidos em CO ou CO₂. Portanto, as principais fontes de hidrocarbonetos aromáticos são o carvão de pedra, ou hulha e o petróleo (BAIRD, 2002).

Os monoaromáticos presentes no petróleo que mais se destacam são o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno, que são chamados BTEXs. Estes não formam concentrações abundantes na maioria dos óleos brutos. Em sua maior

proporção são produzidos durante o processo de destilação e são associados aos produtos do refino, como a gasolina, o querosene e o óleo diesel (ANDRADE *et al.*, 2010).

Os poliaromáticos possuem em sua estrutura dois ou mais anéis benzênicos, também chamados de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Dentre os constituintes do petróleo, estes apresentam importância ambiental, por possuírem os componentes mais tóxicos do petróleo, além de estarem relacionados a efeito carcinogênico. Outra propriedade em relação aos HPAs é que, alguns destes possuem baixo peso molecular e conseqüentemente, são bastante solúveis em água, o que contribui para aumentar o risco de contaminações (KENNISH, 2004).

De acordo a com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (USEPA), existem mais de 100 tipos diferentes de HPAs. Entretanto, ela estabelece uma lista com os 16 HPAs considerados prioritários no monitoramento ambiental (Tabela 2). As prioridades destes compostos está relacionada às informações químico-física, toxicológica, industriais e ambientais, além das propriedades de carcinogenicidade e de ocorrência ao meio (VERSCHUEREN, 2001).

Tabela 2. Estruturas químicas e efeitos tóxicos dos 16 HPAs considerados poluentes prioritários pela USEPA

Nomenclatura (IUPAC)	Estrutura	Efeito	Nomenclatura (IUPAC)	Estrutura	Efeito
Naftaleno		tóxico	Acenaftileno		mutagênico
Acenafteno		mutagênico	Fluoreno		mutagênico
Antraceno		mutagênico	Fenantreno		tóxico e mutagênico
Fluoranteno		carcinogênico e mutagênico	Pireno		carcinogênico e mutagênico
Criseno		carcinogênico e mutagênico	Benzo (a) antraceno		carcinogênico e mutagênico
Benzo (b) fluoranteno		carcinogênico e mutagênico	Benzo (k) fluoranteno		carcinogênico e mutagênico
Benzo (a) pireno		carcinogênico e mutagênico	Dibenzo (a,h) antraceno		carcinogênico e mutagênico
Benzo (g,h,i) perileno		carcinogênico	Indeno (1,2,3 cd) pireno		carcinogênico

Fonte: (SIMS *et al.*, 1988).

Contudo, pesquisas relacionadas afirmam que as moléculas de HPAs em si não são agentes carcinogênicos, elas devem ser transformadas no organismo

mediante várias reações metabólicas antes de serem produzidas as verdadeiras espécies causadoras de câncer (BAIRD, 2002). Portanto, diante do exposto é indiscutível que muitos desses compostos apresentam risco à saúde humana, bem como a biota terrestre.

2.2 Impactos Ambientais Ocasionados por Petróleo e Derivados

Por ser um líquido o petróleo e derivados são fáceis de serem transportados em oleodutos. No entanto, problemas ambientais são comuns durante sua exploração, bem como seu transporte, armazenamento e refino. É indiscutível que no transcorrer destes processos, em especial com o transporte, acidentes podem advir e o material ser derramado no ambiente. O problema é ainda mais grave quando ocorrem desastres em grandes navios petroleiros, resultando em derramamento de enorme volume de petróleo no mar. Consequentemente, são poucos os animais que vivem na superfície dos oceanos que conseguem sobreviver ao impacto resultante (ROCHA *et al.*, 2009).

Do início da década de 1970 até o final de 2016, aproximadamente 10 mil acidentes envolvendo petróleo foram registrados pela Federação Internacional dos Proprietários de Navios Poluidores (ITOPF - *The International Tanker Owners Pollution Federation Limited*), que ocasionaram derramamento de aproximadamente 5,74 milhões de toneladas de petróleo e derivados em ecossistemas marinhos (ITOPF, 2016).

Segundo a ITOPF, somente no ano de 2016 foram derramados no ambiente uma quantidade de aproximadamente 6.000 toneladas de petróleo, através de incidentes com petroleiros. Os registros são de quatro derramamentos de tamanho médio, ou seja, aproximadamente 700 toneladas de petróleo e óleo diesel. O primeiro acidente registrado foi em janeiro em um porto na América do Sul, neste o impacto ocorreu a partir de derramamento de petróleo durante as operações de carregamento. O segundo incidente ocorreu em agosto, neste envolveu óleo combustível naval que também foi derramado durante as operações de carregamento. Os dois restantes, que resultaram em incêndios, foram relatados no último trimestre do ano nos EUA e na China (ITOPF, 2016).

Porém, nas últimas décadas observou-se um declínio acentuado na quantidade médio de acidentes envolvendo derramamento de petróleo (Figura 3). No entanto, práticas apontando remediar os danos foram poucas executadas. Segundo a ITOPF, ela vem contribuindo em ações que tangem orientações,

contenção, bem como na remediação de áreas contaminadas por algum tipo específico de poluentes. Abaixo encontram-se alguns impactos ambientais que merecem uma melhor abordagem, devido sua magnitude bem como a problemática acarretada ao local (ITOPF, 2016).

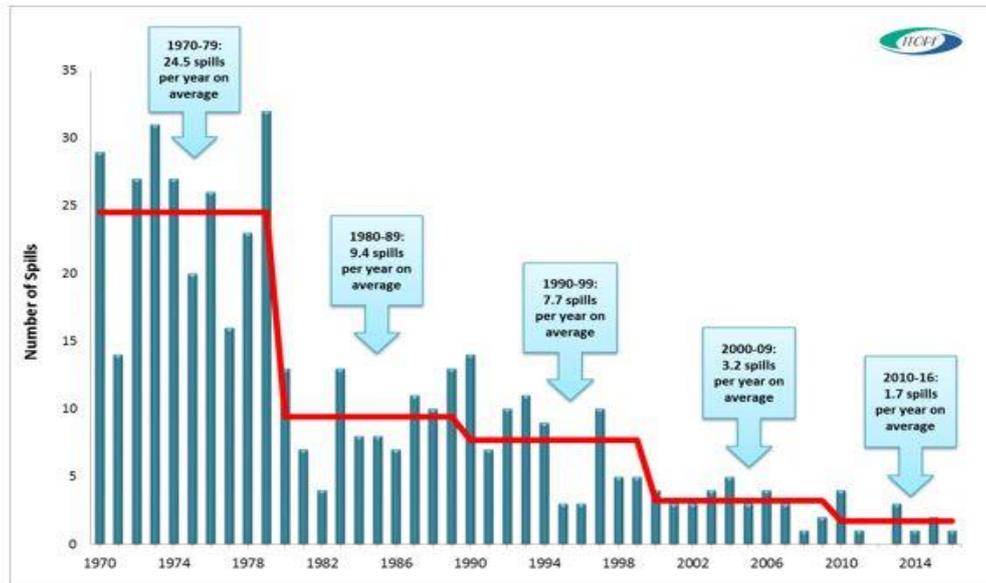


Figura 2. Registros médio de acidentes ambientais entre os anos de 1970 a 2014
Fonte: (ITOPF, 2016)

Guerra do Golfo Pérsico: em 1991 adveio o maior desastre ambiental da história, denominado à guerra do Golfo Pérsico. Contudo, há discussões sobre a verdadeira origem, grupos defendem que esse não foi realmente um acidente, uma vez que as forças iraquianas comandada pelo presidente do Iraque Saddam Husein, abriram as válvulas dos poços de petróleo e oleodutos localizados no Kuwait, liberando para o ambiente aproximadamente 2 bilhões de litros de petróleo, resultando danos à vida selvagem no Golfo Pérsico (BARBOSA, 2010).

Explosão da plataforma Intox I: Em Junho de 1979 aconteceu na baía de Campeche, localizada no México a explosão da plataforma Intox I, este acidente resultou na liberação de aproximadamente 454 mil toneladas de petróleo ao mar (BARBOSA, 2010).

Explosão do Poço Fergana Valley (Uzbequistão): Este foi classificado como uma dos maiores acidentes terrestres já registrados na história. Em março de 1992 ocorreu a explosão de um poço no Vale da Fergana afetando uma das áreas mais densamente povoadas e agrícolas da Ásia Central, liberando para o meio aproximadamente 258 mil toneladas de petróleo (BARBOSA, 2010).

Explosão do navio petroleiro Exxon Valdez: em 24 de março de 1989 adveio não o maior acidente ambiental, mas a explosão do navio petroleiro Exxon Valdez adentrou para a história. A embarcação americana bateu em rochas no Estreito Prince William, no Alasca, resultando no derrame de 40 milhões de litros de petróleo, em uma região sob proteção ambiental, contaminando 2.000 quilômetros de um litoral intocado, matando milhares de aves marinhas, focas, lontras e orcas (ITOPF, 2016).

Entretanto, segundo Tortora *et al.*, (2012), foi justamente após este acidente, que ocorreu um dos mais promissores sucessos da biorremediação. Para o tratamento os cientistas depositaram na região fertilizantes nitrogenados e fosfatados de plantas (bioestimulação). Com isso houve um aumento da biomassa bacteriana do gênero *Pseudomonas*, resultando na eliminação do petróleo da região.

2.2.1 Desastres ambientais acarretados por embarcações de pequeno e médio porte e potenciais risco de contaminação nos rios Amazônicos

A região amazônica é caracterizada pelo modo de transporte, onde a maioria das pessoas utilizam barcos recreios como meio de condução entre as cidades. Em relação a movimentação de pessoas, estima-se que por ano, uma média de 13,6 milhões de passageiros navegam pelos rios amazônicos (ANTAQ, 2013).

Outras embarcações desta natureza são utilizadas como balsas para o transporte de mercadorias. De acordo com a Capitania Fluvial da Amazônia Ocidental (CFAOC), há um considerável fluxo de navegações desta classe nos rios amazônicos, sendo que em muitas destas ocorrem derramamento de combustíveis, durante o abastecimento, bem como durante sua trajetória, contribuindo com a poluição ambiental desta região (CFAOC, 2013).

Os meios de locomoção utilizados na região, por serem movidos por derivados de petróleos são possíveis fontes de contaminação. O risco ambiental está relacionado com possibilidade do combustível armazenado no tanque das máquinas, ou mesmo estocado para reabastecimento, ir parar nos rios e lagos. Dada a grande extensão territorial percorrida por essas embarcações, a quantidade de combustível transportado é da ordem de centenas a milhares de litros. Acidentes na região são pouco relatados, principalmente aqueles envolvendo embarcações de pequeno e médio porte. Segundo estimativas da CFAOC somente nos estados do

Amazonas, Acre, Rondônia e Roraima, foram registrados 646 acidentes nos últimos 6 anos (CFAOC, 2013).

Outro fator que merece abordagem é a construção do oleoduto Urucu-Coari. A preocupação com os riscos de contaminação dos rios da região existem há bastante tempo, porém, foi só com a descoberta de petróleo na década de 80 na província petrolífera de Urucu, que a preocupação com a contaminação dos rios da bacia Amazônica ganhou maior repercussão. Tal província, localizada a cerca de 650 km de Manaus, a margem esquerda do Rio Solimões, produz aproximadamente 55 mil barris de petróleo por dia. Esse óleo produzido é conduzido por oleoduto até o terminal da cidade de Coari e então transportado em navios-tanques até a refinaria localizada em Manaus (Figura 3) (PETROBRÁS, 2017).

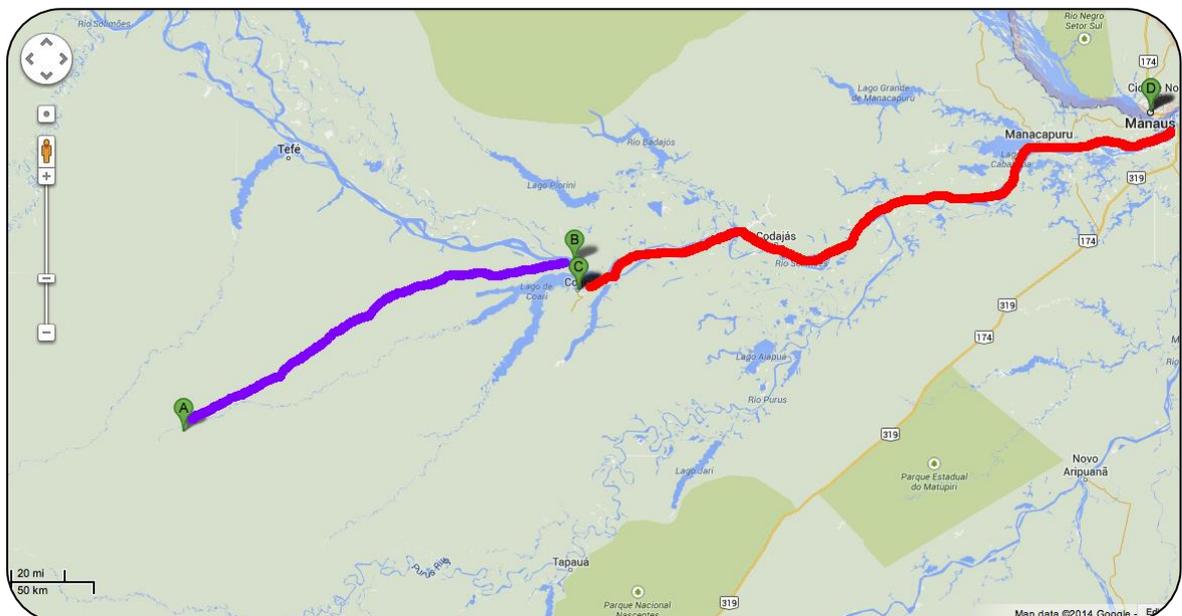


Figura 3. Transporte do petróleo da Província de Urucu até a cidade de Manaus
A– Província Petrolífera de Urucu; B – Terminal Fluvial da Transpetro no Rio Solimões; C- Cidade de Coari; D – Manaus.

Fonte: (Petrobrás, 2017).

Embora sejam seguidos rígidos protocolos de segurança para prevenir derramamentos, esse tipo de transporte representa riscos para o ambiente e acidentes de todas as magnitudes podem ocorrer (OLIVEIRA, 2010). Diante da notável problemática relacionada a poluição causada por petróleo e derivados, a busca de alternativas que promovam a recuperação de área afetadas é um caminho promissor e que deve ser cada vez mais explorado.

2.3 Biorremediação e Biodegradação

A população está se sensibilizando frente aos impactos acarretados ao planeta e está procurando métodos que objetivem a contenção e/ou minimização desses danos. Deste modo, a busca por alternativas tecnológicas para a recuperação de áreas contaminadas por petróleo, bem como derivados vem crescendo significativamente e, dentre as técnicas utilizadas encontra-se a biorremediação (BAKER e HERSON, 1994).

A biorremediação é o uso de organismos vivos, sobretudo microrganismos, para degradar poluentes ambientais. É uma tecnologia que apresenta atualmente um crescimento rápido, sobretudo em colaboração com a engenharia genética, utilizadas para desenvolver linhagens de micróbios que tenham a capacidade de lidar com poluentes específicos. A biorremediação é particularmente usada para remediação de depósitos de lixo e solos contaminados com compostos orgânicos semivoláteis, como por exemplo os HPAs (BAIRD, 2002).

A biorremediação explora a capacidade dos microrganismos, especialmente de bactérias e fungos, de degradar muitos tipos de resíduos, normalmente as substâncias mais simples e menos tóxicas. De fato, durante muitos anos pensou-se que os microrganismos podiam e deviam biodegradar completamente “todas” as substâncias orgânicas, incluindo todos os poluentes contidos em águas naturais ou no solo; a descoberta que alguns compostos, especialmente os organoclorados, eram resistente a uma rápida biodegradação foi a responsável pela retificação desta concepção errônea. As substâncias resistentes a biodegradação são chamadas de recalcitrantes. Além disso, outras substâncias, como muitos compostos orgânicos, biodegradam-se apenas parcialmente, em vez de mineralizar-se totalmente, elas são transformadas em compostos orgânicos, alguns dos quais podem ser recalcitrantes ou mesmos mais tóxico que as substâncias originais (BAIRD, 2002).

Para que uma técnica de biorremediação funcione com efetividade, devem ser cumpridas algumas condições: 1º- os resíduos devem ser suscetíveis a degradação biológica e estar presente sob uma forma física acessível para os microrganismos; 2º- os microrganismos apropriados devem estar disponíveis; 3º- as condições ambientais- tais como pH, temperatura e nível de oxigênio- devem ser adequadas (BAIRD, 2002).

Um exemplo de biodegradação é a degradação de HPAs por microrganismos do solo, quando a terra está contaminada por gasolina e petróleo. O maior projeto da

história foi o tratamento do petróleo derramado pelo navio-tanque Exxon Valdez no Alaska em 1989. A biorremediação consistiu na adição de fertilizantes contendo nitrogênio ao longo dos mais de 100 quilômetros de litoral que foram contaminados, estimulando desta maneira o crescimento de microrganismos nativo, incluindo os que podiam degradar hidrocarbonetos. Nessa operação, foi degradado tanto o petróleo da superfície quanto o das camadas adjacentes à superfície (BAIRD, 2002).

Em outros contextos, como solos contaminados, a biodegradação dos HPAs é lenta, já que eles se encontram fortemente adsorvidos sobre as partículas do solo e não são facilmente liberados para a fase aquosa, na qual poderia ocorrer a sua biodegradação. Os solos contaminados com HPAs são especialmente predominantes nas imediações das fábricas de gás, utilizadas entre 1850-1950 para produção de gás urbano, a partir de carvão ou petróleo. A poluição se dá principalmente na forma de depósitos de alcatrão, que são produtos residuais formados por líquidos orgânicos de alta massa molar, mais denso do que a água, que estão misturados com o solo e que são constituídos por BTEXs (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) e HPAs. Infelizmente, as águas subterrâneas que entram em contato com o alcatrão podem se tornar contaminadas pela dissolução de alguns de seus constituintes mais solúveis, como benzeno e naftaleno, embora a maior parte do alcatrão sejam insolúveis. Outros contaminantes de solos próximos as fábricas de gás são os fenóis e o cianeto (BAIRD, 2002).

Em processos de biorremediação existem basicamente duas técnicas a serem empregadas em áreas contaminadas: a técnica *in situ* e a *ex situ*. Esta refere-se ao tratamento realizado no local onde ocorreu a contaminação, aquela o tratamento ocorrerá em laboratório, ou seja, a porção do meio contaminado é removida e transportada para o local de tratamento e posterior devolução desse material após o processo ser concluído. Porém, o esforço de transpor toda uma área contaminada para um local diferente faz dessa estratégia uma das mais caras, além de mais trabalhosas e conseqüentemente, pouco utilizada. A descontaminação *in situ*, é a mais utilizada por apresentar menores custos e tempo de tratamento (BAKER e HERSON, 1994).

Alguns métodos empregados nas técnica *in situ* são: bioestimulação e bioaumentação. A bioestimulação consiste em oferecer condições para que ocorra uma aceleração na reprodução microbiana e de suas atividades metabólicas. Isso é feito pela adição de oxigênio, água e nutrientes ao meio ambiente contaminado,

criando assim condições favoráveis para que os microrganismos presentes se desenvolvam com maior rapidez. Já a bioaugmentação consiste na introdução, no ambiente contaminado, de microrganismos específicos capazes de degradar o contaminante presente no meio e que estes sejam adaptados às condições ambientais (BAKER e HERSON, 1994).

Dentre as tecnologias *ex situ*, pode-se destacar biorreatores e biopilhas. Naquele método, a biodegradação ocorre em um recipiente ou reator, onde o material (líquidos ou suspensões) contaminado é misturado com água formando uma suspensão, com 5 a 50% de sólidos, que é agitada mecanicamente, aumentando assim a aeração, a homogeneidade dos poluentes e sua disponibilidade aos microrganismos. Parâmetros físicos e químicos, como pH, disponibilidade de nutrientes, aeração e temperatura são ajustados para a máxima produção de biomassa. Após a redução dos contaminantes aos níveis desejados, a suspensão é desidratada e a água pode ser reutilizada no biorreator. Já a biopilhas é um processo de descontaminação de solos, realizado por microrganismos aeróbios. No emprego desta técnica, o substrato contaminado é removido do local de origem e colocado em pilhas, com ou sem aeração, controlando-se a lixiviação e o escoamento superficial dos líquidos. Portanto, tanto as técnicas *in situ* e *ex situ* objetivam a biodegradação de contaminantes ambientais (BAKER e HERSON, 1994).

2.3.1 Biodegradação de Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (HTPs) por Bactérias ou Consórcios Microbianos

Normalmente os microrganismos degradadores de compostos recalcitrantes, encontram-se em pequeno número no solo, entretanto, pesquisas relacionadas apontam maior probabilidade de encontrá-los em ambientes contaminados (HARITASH e KAUSHIK, 2009).

Embora microrganismos utilizem diferentes processos metabólicos para obter energia, são os heterotróficos os mais importantes usados na degradação de contaminantes orgânicos. Isso por que eles empregam a respiração para oxidar tais compostos como fonte de carbono e energia, seja por meio da fermentação, respiração aeróbica e anaeróbica. É justamente nesse princípio que se baseia todo o processo de biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo: a utilização dos compostos orgânicos do petróleo como fonte de carbono e energia (ALEXANDER, 1994).

Desde 1950 pesquisas voltadas à biorremediação vem estudando e isolando bactérias com potencial degradador para substâncias recalcitrantes, principalmente as pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Beijerinckia*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Paracoccus*, *Burkholderia*, *Microbacterium*, *Gordonia*, entre outros (HARITASH e KAUSHIK, 2009).

Outra alternativa que vem sendo muito empregada em processos de biorremediação, bem como em estudos relacionados, são os consórcios microbianos. Estes são constituídos por uma complexa população de diferentes espécies que, em sinergismo, são potencialmente aplicados na biodegradação de poluentes e derivados do petróleo (COSTA *et al.*, 2007).

Pesquisas relacionadas apontam que no metabolismo bacteriano, as enzimas envolvidas no processo de degradação de compostos recalcitrantes são as pertencentes ao grupo das oxigenases. Estas enzimas possuem a capacidade de iniciar o processo de degradação de xenobióticos (HARITASH e KAUSHIK, 2009).

2.3.2 Oxigenases

As oxigenases compõem o grupo de enzimas envolvidas no processo de degradação. Várias vias metabólicas de degradação dos compostos oriundos de petróleo, principalmente para HPAs, já foram identificadas em diferentes microrganismos, porém as mais estudadas são as do metabolismo aeróbico realizado pelas bactérias, pelos fungos lignolíticos e pelos fungos não-lignolíticos (HARITASH e KAUSHIK, 2009).

Na via aeróbica em geral, um composto orgânico quando é oxidado perde elétrons para um aceptor final de elétrons, que é reduzido (ganha elétrons). O oxigênio comumente atua como aceptor final de elétrons quando presente e há oxidação de compostos orgânicos, com a redução do oxigênio molecular. A grande maioria dos hidrocarbonetos são biotransformados sobre a condição aeróbica, onde o oxigênio atua como um co-substrato para a enzima que pode inicializar a degradação do hidrocarboneto e por fim é utilizado como aceptor final de elétrons para a geração de energia (BRADY e HUMISTON, 2012).

No metabolismo bacteriano, a oxigenação inicial dos HAPs é realizada por uma enzima intracelular dioxigenase. Esta tem a capacidade de degradar compostos xenobióticos como as bifenilas policloradas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Sua função é reconhecer o HPA e iniciar o processo de degradação,

para isto ela primeiramente adiciona dois átomos de oxigênio, ocasionando a quebra da estabilidade do anel benzênico (HARITASH e KAUSHIK, 2009).

Após sucessivas oxidações, o último anel aromático é transformado em um dos intermediários centrais da via de degradação dos HAPs, que pode ser o catecol, o protocatecol ou o gentisato. Até aqui atuaram as enzimas denominadas de periféricas, que têm a função de reconhecer as moléculas dos HAPs e convertê-las nestes intermediários centrais. A partir de então, atuam as denominadas enzimas de fissão, que converterão os intermediários centrais em compostos que possam ser transformados através das vias comuns da bactéria e utilizá-los como fonte de carbono e energia para o seu crescimento, resultando na degradação destes compostos e na sua eliminação do ambiente (HARITASH e KAUSHIK, 2009).

No entanto, para que ocorra a atuação das enzimas acima descritas, faz-se necessário encontrar organismos que as possuam. Estudos revelam que o tubo digestivo dos isópteros empregam uma complexa e enorme variedades de microrganismos (THONGARAM *et al.*, 2005), incluindo bactérias isoladas de cupins com potencial para degradar compostos aromáticos (BUGG *et al.*, 2010).

2.4 Térmitas: Conceito, Classificação, Morfologia, Biologia e Alimentação

2.4.1 Conceito

Estudos relacionados abordam a existência de cerca de 2.800 espécies de isópteros descritas no mundo e aproximadamente 320 registradas no Brasil. Porém, estima-se que o número total de espécies existentes podem ser de aproximadamente 4 mil a nível mundial e 500 no Brasil. Existem dois nomes mais comuns para as espécies do grupo no Brasil, cupins e térmitas (CONSTANTINE, 2012).

Os cupins são pertencentes ao Reino Animalia, Filo Arthropoda, Classe Insecta, Subfilo Hexapoda, Ordem Isóptera: do grego *isos* significa igual e *pteron* significa asas, portanto, o termo Isóptera refere-se à semelhança das asas anteriores com a asas posteriores na maioria das espécies atuais (CONSTANTINE, 2012).

2.4.2 Classificação

Para classificação dos térmitas a mais usada é a de Grasse (1986), o qual aponta a existência de sete famílias: Hodotermitidae, Kalotermitidae, Mastotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae, Térmitidae e Termopsidae. Também podendo ser classificados em cupins inferiores, os pertencentes a famílias

(Hodotermitidae, Kalotermitidae, Mastotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae e Termopsidae) e cupins superiores os pertencentes a família Térmitidae (CONSTANTINE, 2012).

Família Hodotermitidae: juntamente com a Kalotermitidae é relativamente primitiva em sua estrutura, todavia apresenta hábitos especializados de vida (THONGARAM *et al.*, 2005).

Família Kalotermitidae: constituída por espécies que vivem em madeira seca, formando pequenas colônias, sem operária verdadeiras, sendo o trabalho realizado pelos indivíduos jovens. Os soldados ocorrem em baixa proporção, apresentam cabeça alongada ou curta e fragmótica. A cabeça fragmótica é usada para fechar os túneis, impedindo a entrada de inimigo. Alimentam-se exclusivamente da madeira na qual vivem (CONSTANTINE, 2012).

Família Mastotermitidae: também é uma das famílias mais primitivas, com uma só espécie viva, *Mastotermes darwiniensis Froggatt*, que ocorre na Austrália (THONGARAM *et al.*, 2005).

Família Rhinotermitidae: são todos xilófagos de hábito geralmente subterrâneo. Nenhuma espécie neotropical constrói ninho definido, podendo estar em madeira ou no solo. As colônias são grandes e de crescimento rápido (CONSTANTINE, 2012).

Família Serritermitidae: endêmica da América do Sul, com dois gêneros e três espécies. *Serriterms serrifer* ocorre apenas no cerrado, de Minas Gerais até Amazonas e Pará, vivendo como inquilino em ninhos de *Cornitermes* spp. *Glossotermes oculatus* ocorre na Guiana e *Glossotermes sulcatus* na Amazônia brasileira (CONSTANTINE, 2012).

Família Térmididae: é a maior família, considerada a mais evoluída e corresponde a 70% das espécies conhecidas. Os hábitos e morfologia dos soldados são muito variados. Vivem em colônias grandes e constrói ninhos complexos. São xilófagos e capazes de digerir a celulose com suas próprias enzimas, ou por meio de associações com fungos e bactéria (CONSTANTINE, 2012).

Família Termopsidae: é uma pequena família de térmitas primitivas que contém apenas quatro ou cinco gêneros, com 13–20 espécies vivas (THONGARAM *et al.*, 2005).

2.4.3 Morfologia

Estudos apontam que a morfologia externa dos insetos é caracterizada como sendo indivíduos pequenos, asas longas e membranosas, deiscentes (eliminadas por uma ruptura em uma linha basal de fragilidade); antenas curtas, filamentosas, com 11 a 33 artículos; cercos pequenos e diminutos; ovipositor reduzido ou ausente e polimorfismo marcado (BRUSCA, 2007).

Os térmitas são insetos hemimetábolos, apresentam hábitat terrestres, seu tamanho varia entre 3 a 25 mm de comprimento, sem considerar as asas. São sociais e polimórficos, vivendo em colônia de tamanhos variáveis, apresentam formas ápteras estéreis (operários e soldados) e reprodutores alados (imagos). Olho composto presente nos adultos, vestigial ou ausentes nos operários e soldados. Possuem aparelho bucal mastigador, as antenas podem ser moniliforme ou filiforme, com 10 a 32 artículos e tarso com três a cinco tarsômeros, quatro são encontrados em todas as espécies brasileira (CONSTANTINE, 2012).

Asas anteriores são semelhantes as posteriores, exceto em *Mastotermes darwiniensis* Froggatt, da Austrália. Além de apresentarem uma linha basal, onde se quebram após a revoada, cerco geralmente curto, apresentando nas espécies brasileiras dois artículos, genitália externa ausente ou reduzida, exceto em *Stolotermes inopinus* Gay, da Nova Zelândia (CONSTANTINE, 2012).

2.4.4 Biologia

Todos os cupins são insetos eussociais, vivendo em colônias de tamanhos diversos e subdivididos em castas, de acordo com as funções exercidas em uma colônia. Em um ninho de cupins existem quatro castas distintas denominadas: operários, soldados, imaturos e reprodutores. Estudos apontam que as castas são compostas por indivíduos de sexos diferentes (macho e fêmea) e que a formação das castas em cupins é determinada fisiologicamente pelos hormônios da ecdisona, em especial ao hormônio juvenil (CONSTANTINE, 2012).

A casta das operárias é a mais numerosa e são constituídas geralmente por indivíduos estéreis e cegos, que apresentam mandíbulas normais, possuem função específica, como a construção de ninhos, cuidar dos membros que pertencem a outras castas, bem como a coleta de alimentos e alimentação de todos os demais indivíduos pertencentes a colônia. Operários verdadeiros são normalmente estéreis e nunca se transformam em reprodutores, podendo sofrer mudas e se transformarem em soldados (CONSTANTINE, 2012).

Os soldados são caracterizados por não passarem pelo estágio de muda, apresentam enorme variação morfológica, especialmente na cabeça, em função dos diferentes mecanismos de defesa presentes em diferentes espécies, esta parte do corpo é muito modificada e esclerosada, já que apresentam adaptações defensivas, suas mandíbulas são ampliadas e são úteis na defesa das colônias, assim como as operárias são geralmente estéreis e cegos (Figura 4). Não possuem asas e são incapazes de alimentar-se por mérito próprio. A proporção de soldados em uma colônia varia entre 0 e 25% entre diferentes espécies, contudo a maioria encontra-se na faixa de entre 1 e 6% (CONSTANTINE, 2012).



Figura 4. Características morfológicas dos soldados
Fonte: (www.ninfa.bio.br).

Os imaturo de cupins são encontrados apenas dentro dos ninhos, são protegidos e alimentados pelos operários. Os sujeitos do primeiro ínstar são todos iguais, mas a partir do segundo ínstar, é possível distinguir os indivíduos que darão origem às castas estéreis (operários e soldados) ou aos reprodutores (CONSTANTINE, 2012).

Existem dois grupos distintos de reprodutores os primários e os secundários. Os reprodutores primários são adultos imaginiais que fundaram a colônia após o voo nupcial e são denominados de rei e rainha. Uma característica marcante na rainha é o bastante desenvolvimento dos ovários, isto resulta em um aumento considerável do abdômen denominado de fisogastria. Já os secundários são indivíduos que assumem o papel de reprodutores na própria colônia onde nasceram, este evento somente ocorre em caso de morte dos reprodutores primários (CONSTANTINE, 2012).

Em geral podemos caracterizar os reprodutores como indivíduos que apresentam asas e olhos compostos completamente desenvolvidos. Outro fator que merece abordagem é o acasalamento, este evento somente ocorre em uma época específica no ano e após a cópula as asas são descartadas (CONSTANTINE, 2012).

As colônias de cupins formam ninhos em madeira que está dentro ou sobre o solo. Uma colônia típica é composta por um casal de reprodutores rei-rainha, grande números de operários, soldados e imaturos. Os ninhos de cupins também são denominados cupinzeiros ou termiteiros e, sua arquitetura varia desde simples túneis escavados na madeira até estruturas extensas e complexa (CONSTANTINE, 2012).

Os termiteiros costumam abrigar uma verdadeira fauna associada, que inclui insetos e outros artrópodes, cobras, lagartos, sapos, pequenos mamíferos, aves entre outros (CONSTANTINE, 2012).

2.4.5 Alimentação

Os térmitas se alimentam de uma grande de variedade de produtos de origem animal, como couro, lã, excrementos de matérias de origem vegetal como madeira (viva ou morta). Contudo podem também comer raízes de plantas, humos e etc (MORESCHI, 1998).

A digestão da madeira fornece aos cupins as proteínas e os sais minerais necessários, enquanto que a celulose fornece a energia para seu metabolismo. Entretanto, não são os cupins que degradam a celulose, bem como a lignina, contida no vegetal, uma vez que são desprovidos de enzimas para esta finalidade, a digestão é realizada por microrganismos simbiotes como protozoários (nas espécies inferiores) e bactérias e fungos (na espécies superiores) existentes no intestino posterior (MORESCHI, 1998).

Portanto, esta ação de alimentar-se de madeira é decorrente de processos evolutivos entre espécies, já que a dieta a base de vegetal está relacionada a processos de simbiose entre cupins, protozoários e bactérias (LIMA e LEONARDO, 2007).

De acordo com sua preferência alimentar são classificados em seis grupos distintos: 1) xilófagos, alimentam-se exclusivamente ou principalmente de madeira; 2) geófagos, alimentam-se de matéria orgânica do solo, ingerindo grande quantidade de solo mineral; 3) intermediários, alimentam-se de matéria vegetal semidecomposta, especialmente de madeira podre; 4) Comedores de folhas da serapilheira ou ceifadores, estes cortam pedaços de folhas mortas, podendo comê-las no local ou carregá-las para o ninho; 5) especializados, algumas espécies podem alimentar-se predominantemente de fungos; 6) cultivadores de fungos, caso dos Macrotermitinae, estes ocorrem somente na África e Ásia (CONSTANTINE, 2012).

Alguns livros de Biologia com frequência citam os cupins como exemplo de simbiose, como se todos eles fossem xilófagos e dependesse de protozoários simbiontes localizados no intestino. Na verdade os xilófagos não chegam a metade das espécies da ordem e nem todos dependem de simbiontes para digerir a celulose. Os protozoários simbiontes não ocorrem em Termitidae, esses correspondem a 70% das espécies conhecidas. Os cupins xilófagos desta família são capazes de digerir celulose com suas próprias enzimas (CONSTANTINE, 2012).

O trato intestinal dos insetos abrigam uma ampla variedade de microrganismos. Contudo, pesquisas afirmam que bactérias são mais abundantes e diversas na microbiota dos térmitas. Um fator crucial para esta variedade se deve ao fato do intestino dos cupins ser altamente compartimentalizado. Em outro estudo sobre a diversidade da comunidade bacteriana em quatro espécies de térmitas superiores pertencentes a vários grupos funcionais, foi observada a dominância do filo Firmicutes e das classes Clostridia e Bacilli (THONGARAM *et al.*, 2005).

2.5 *Enterobacter cloacae*

Enterobacter cloacae pertence ao domínio Bactéria, filo Proteobacteria, classe Gramproteobacteria, ordem Enterobacteriales, família Enterobacteriaceae e gênero Enterobacter. É um bacilo Gram negativo, as espécies desta bactéria *E. cloacae* podem ser encontradas nas fezes de humanos, animais e insetos, na água, plantas, e etc. São bactérias oportunista e raramente causam doença em indivíduos saudáveis (MEZZATESTA *et al.*, 2012).

No que se refere a pesquisa sobre biorremediação de ambientes contaminados por petróleo e derivados, há relatos de estudos que utilizaram *E. cloacae* objetivando verificar seu potencial degradador quanto a mazute (óleo combustível pesado, obtido como resíduo da destilação do petróleo, mais comumente chamado óleo diesel), bem como petróleo e derivados. De acordo com khorasani *et al.*, (2013), a bactéria *E. cloacae* possui competência para degradar compostos recalcitrantes. Durante a pesquisa, foi adicionado mazute gradativamente ao meio de cultura e após 10 dias de cultivo, verificou-se através de cromatografia gasosa a diminuição nas concentrações iniciais de mazute.

Em outro trabalho, verificou-se a competência de *E. cloacae* quanto a degradação de petróleo bruto presente em água contaminada. Segundo Ahmed & Alzubaidi e Hamza (2014), em ambientes contaminados há maior probabilidade de encontrar microrganismo com capacidade para degradar poluentes. Neste trabalho

foram isolados de água impactada por petróleo bruto seis isolados de *E. cloacae*. Dentre os isolados, a *E. cloacae* E1 apresentou o maior índice de emulsão (E24%). Foi realizada a quantificação das frações degradadas do petróleo por meio de cromatografia gasosa e, verificou-se que a mesma tinha degradado \pm 40% do óleo bruto, incluindo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).

Em outro trabalho foi analisada a resistência de *E. cloacae* frente a mercúrio. De acordo Martins *et al.* (2008), algumas bactérias incluindo a *E. cloacae* desenvolveram um mecanismo de resistência ao mercúrio, baseado em um grupo de genes localizados em um operon (operon mer). Estes genes permitem que as bactérias desintoxiquem Hg (II) em mercúrio metálico volátil através de sua redução enzimática.

Portanto, no que se refere a processos de biorremediação de áreas impactadas por petróleo e derivados, há evidências da competência de *E. Cloacae*. Estudos revelam que ela é parte integrante da microbiota intestinal de humanos, animais e insetos, em especial os cupins. No que se refere a alimentação dos térmitas, deve-se ressaltar que alguns grupos de cupins (xilófagos) empregam material vegetal (medeira) em sua alimentação (LIMA e LEONARDO, 2007).

2.6 Lignina: Estrutura e Complexidade

A lignina é classificada como pertencente a classe dos flavonóides, ou seja, são substâncias oriundas do metabolismo secundário dos vegetais. Apresentam-se como um composto fenólico, ou seja, possui um grupo hidroxila (O-H) ligado a um anel aromático (um anel de seis carbonos, contendo três duplas ligações (RAVEN *et al.*, 2013).

Ela desempenha inúmeras funções nos vegetais, porém, a principal função da lignina está associada à resistência e rigidez da parede celular. Ela também impermeabiliza a parede celular, assim ajuda no transporte de água pelos vegetais, uma vez que ela contribui para as células condutoras de água resistirem a tensão gerada pela corrente de água. Outra função da lignina é apontada pela deposição em resposta a vários tipos de injúrias e ataques por fungos (RAVEN *et al.*, 2013).

Ela é depositada na parede celular dos vegetais, sendo considerado o segundo composto mais abundante na terra, sua concentração somente é inferior à da celulose. É um polímero formado a partir de três tipos de monômeros: álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (RAVEN *et al.*, 2013).

Portanto, ela é um heteropolímero aromático altamente complexo e recalcitrante. A respeito destas características, várias pesquisas vem sendo desenvolvidas objetivando a despolimerização da lignina. Porém, esta não é uma tarefa fácil, já que ela é altamente resistente à ruptura. Por outro lado se a degradação biocatalítica da lignina puder ser aproveitada e controlada, ela representa potencialmente uma rica fonte de produtos químicos aromáticos renováveis (BROWN e CHANG, 2013).

Diante do exposto dos parágrafos anteriores, a degradação microbiana da lignina e dos HPAs têm sido extensivamente estudada, em especial pelos fungos e microrganismos de forma geral, bem como os integrantes intestinais de térmitas. Estas pesquisas se devem a complexidade química das substâncias (natureza aromática). Portanto, os estudos se baseiam na analogia entre a estrutura da lignina e dos HPAs, uma vez que existem evidências de bactérias isoladas do intestino de cupins com potencial para degradar aromáticos (BUGG *et al.*, 2013). Pesquisas apontam que a capacidade de um microrganismo em degradar compostos isolúveis em água, como o petróleo, pode ser potencializada se ele produzir biossurfactantes e bioemulsificantes (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

2.7 Produção de biossurfactantes e bioemulsificantes por bactérias degradadoras de petróleo e aplicabilidade destes compostos

Os biossurfactante e bioemulsificante são substâncias produzidas por microrganismos (bactérias, fungos filamentosos ou leveduras), em contrastes ao surfactantes sintéticos que na grande maioria são sintetizados a partir de derivados de petróleo. Os biossurfactantes e bioemulsificantes apresentam caráter anfipático, ou seja, constituída de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. A porção apolar é formada geralmente por uma cadeia hidrocarbonada, já a porção polar pode ser iônica (catiônica e aniônica) e não iônica ou anfotérica (uma molécula capaz de reagir como sendo um ácido ou uma base). Em função da presença de grupos polares e apolares na mesma molécula, os biossurfactante e os bioemulsificantes, tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo) (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Segundo Uzoigwe *et al.*, (2015), os bioemulsificantes não são biossurfactantes, pois há diferenças nas propriedades físico-química e fisiológica destes compostos. Os biossurfactante são moléculas de baixo peso molecular, geralmente são compostos de açúcares, aminoácidos, ácidos graxos e grupos

funcionais como ácido carboxílico. Ele possui a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial entre diferentes fases (líquido-ar-líquido e líquido - líquido-sólido).

Os bioemulsificantes apresentam maior peso molecular que os biossurfactantes, além de apresentar-se como uma mistura complexa de heteropolissacarídeos, lipopolissacarídeos, lipoproteínas e proteínas. Assim como os biossurfactantes, estas moléculas podem emulsionar líquidos imiscíveis tais como os hidrocarbonetos e outros substratos hidrofóbicos. Entretanto, são menos eficazes na redução da tensão superficial. Contudo, a produção de biossurfactante e bioemulsificante por uma espécie, pode aumentar sua capacidade de degradar compostos hidrofóbicos, em especial o petróleo (UZOIGWE *et al.*, 2015).

Muitas são as vantagens dos biossurfactantes frente aos surfactantes químicos, tais como: biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior taxa da redução da tensão superficial, produção a partir de fontes renováveis, estabilidades e etc. Perante as vantagens dos biossurfactante, eles podem ser aplicados em várias áreas como: na agricultura, na construção civil, em indústria de alimentos, papel e farmacêutica, porém sua maior aplicabilidade está relacionada a indústria petrolífera, principalmente na limpeza de tanques, na recuperação melhorada de petróleo (MEOR), bem como em processos de biorremediação, devido ao aumento da solubilidade de compostos (COLLA e COSTA, 2003). Os bioemulsificantes também apresentam importância econômica, pois seus grupos hidrófobos e hidrofílicos, são amplamente utilizados nas indústrias alimentares, agroquímica, cosmética e farmacêutica (ABDEL-EL-HALEEM, 2003).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Selecionar e identificar bactérias associadas a isópteros, coletadas no município de Coari, Região do Médio Solimões, com potencial para degradar petróleo.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar a família de isópteros;
- Avaliar o potencial degradador dos consórcios microbianos e das culturas puras oriundas dos cupinzeiros, quanto ao petróleo;
- Selecionar, caracterizar morfológicamente e realizar a identificação molecular do microrganismo mais eficiente quanto a degradação do petróleo;
- Realizar teste de sensibilidade a antibióticos da bactéria empregada nas análises;
- Investigar as atividades emulsificante, biossurfactante e hidrofobicidade da amostra bacteriana.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O fluxograma mostrado abaixo (Figura 5) permite visualizar, de um modo geral, as etapas deste trabalho, bem como aspectos metodológicos envolvidos na sua execução. Em síntese, as bactérias foram selecionadas e isoladas de isópteros, submetidas a teste de degradação com o objetivo de selecionar o microrganismo para prosseguir com a pesquisa. Posteriormente realizou-se a caracterização morfológica, bem como a identificação molecular do mesmo, além de mapear o perfil de crescimento microbiano, realizar teste de sensibilidade a antibióticos, verificar a atividade emulsificante de sobrenadante de cultura bacteriana, executar teste quanto a hidrofobicidade celular e detecção de produção de biossurfactante. Os detalhes dos procedimentos metodológicos de todas as etapas da pesquisa serão abordadas a seguir.

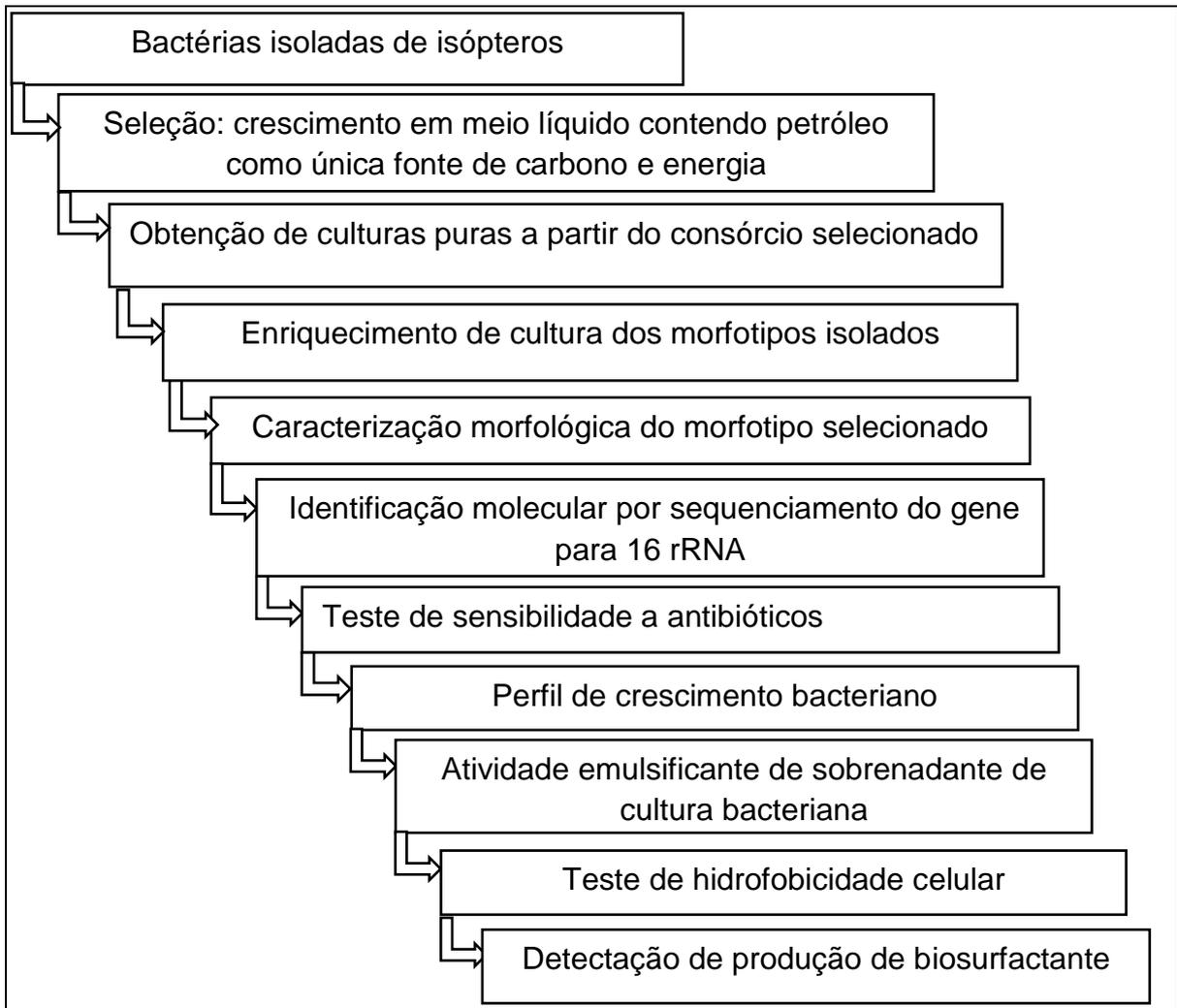


Figura 5. Fluxograma das etapas desenvolvidas na pesquisa

4.1 Coleta e Identificação Taxonômica das Espécies de Isópteros

Foram selecionados e coletados de forma aleatória seis termiteiros da floresta amazônica no município de Coari, Estado do Amazonas. Dentre as seis amostras de cupinzeiros, três foram coletadas do solo e receberam as denominações (S1, S2 e S3) e três arbóreos (A1, A2 e A3). As coletas foram realizadas em dois lugares. Primeiramente na Estrada Coari-Itapéua no quilômetro 3 e posteriormente no Centro de Apoio à Pesquisa do Médio Solimões, também situado a estrada Coari-Itapéua, quilômetro 10. A coleta foi efetivada no transcorrer de um único dia, de acordo com as especificações, localizações e coordenadas que se encontram na (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação dos pontos de coletas dos termiteiros

Ordem de coleta	Nomenclatura dos cupinzeiros	Local de coleta	Origem dos cupinzeiro	Coordenadas	Elevação	Azimute
1°	A1	Estrada Coari-Itapéua	Arbóreo	S04°06.880' / W 063°07.751'	37 m	250
2°	A2	Estrada Coari-Itapéua	Arbóreo	S04°06.948' / W 063°06.485'	40 m	250
3°	S1	Centro de Apoio à Pesquisa do Médio Solimões	Solo	S04°07.134' / W 063°04.457'	41 m	250
4°	A3	Centro de Apoio à Pesquisa do Médio Solimões	Arbóreo	S04°07.158' / W 063°04.452'	34 m	250
5°	S2	Centro de Apoio à Pesquisa do Médio Solimões	Solo	S04°07.242' / W 063°04.401'	42 m	250
6°	S3	Centro de Apoio à Pesquisa do Médio Solimões	Solo	S04°07.277' / W 063°04.407'	51 m	250

As amostras foram armazenadas em recipientes separados e estéreis. Posteriormente, foram transportadas ao laboratório de Microbiologia do Instituto de Saúde e Biotecnologia Campus Médio Solimões- Universidade Federal do Amazonas. No mesmo dia os grupos de cupins foram submetidos a processo de maceração.

Os grupos de térmitas foram identificados taxonomicamente através do uso de chave dicotômicas de identificação de acordo com Constantino (2012). Essa identificação foi realizada pela professora Doutora Ana Claudia Kaminsk, em colaboração com o Laboratório de Entomologia do Instituto de Saúde e Biotecnologia Campus Médio Solimões/UFAM.

4.2 Preparação do Inóculo

Dentro da câmara de fluxo laminar realizou-se a maceração dos grupos de cupins, este procedimento foi executado isoladamente de acordo com as coletas. As amostras de cupins passaram pelo processo de separação, com finalidade de separar os detritos. Em seguida pesou-se 3 g de cada amostra e procedeu-se a maceração em almofariz contendo 10 mL de meio mínimo Bushnell Hass Broth - BH (3,27g/L, pH 7,0).

4.3 Seleção de Bactérias que Utilizam Petróleo como Fonte de Carbono e Energia

Esta etapa de seleção do microrganismo foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Saúde e Biotecnologia Campus Médio Solimões/UFAM (ISB/UFAM).

Procedeu-se: em frasco tipo Erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 87 mL de BH, 3 mL de petróleo (3%) e 10 mL do inóculo (macerados de térmitas), conforme a fotografia (Figura 6).



Figura 6. Maceração dos térmitas

O procedimento acima descrito foi executado dentro da câmara de fluxo, resultando em: um Erlenmeyer como controle abiótico e outros seis para cada uma das amostras coletadas. Os inóculos foram mantidos em plataforma de agitação (SHAKER S L 222, marca SOLAB) a 150 rpm/min a temperatura de 30°C. As culturas foram monitoradas a cada 24h por um período de 30 dias, as observações foram realizadas de acordo com o nível de transformação da camada oleosa e turbidez do meio. O consórcio que apresentou melhor crescimento relacionado com o menor tempo de cultivo, foi selecionado para prosseguir com as análises.

4.4 Obtenção de Culturas Puras a partir do Consórcio Selecionado

Esta etapa foi executada no Laboratório de Microbiologia do ISB/UFAM e o protocolo experimental de obtenção de culturas puras a partir do consórcio selecionado está esquematizado na Figura 7. Após o enriquecimento de cultura o próximo passo foi a preparação de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-7}) e subsequente plaqueamento, ou seja, alíquotas de 100 μ L de cada diluição foram espalhadas com alça de Drigalsky na superfície de placas de Petri, contendo o meio de cultivo Luria Bertani-LB (peptona 10 g/L, NaCl 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e ágar 15 g/L). Incubaram-se as placas a 30°C e após 24h de cultivo, iniciou-se a observação do crescimento de colônias morfológicamente diferentes. A partir do segundo dia de

cultivo, deu-se início a seleção das colônias diferentes, quando estas já apresentaram bom crescimento.

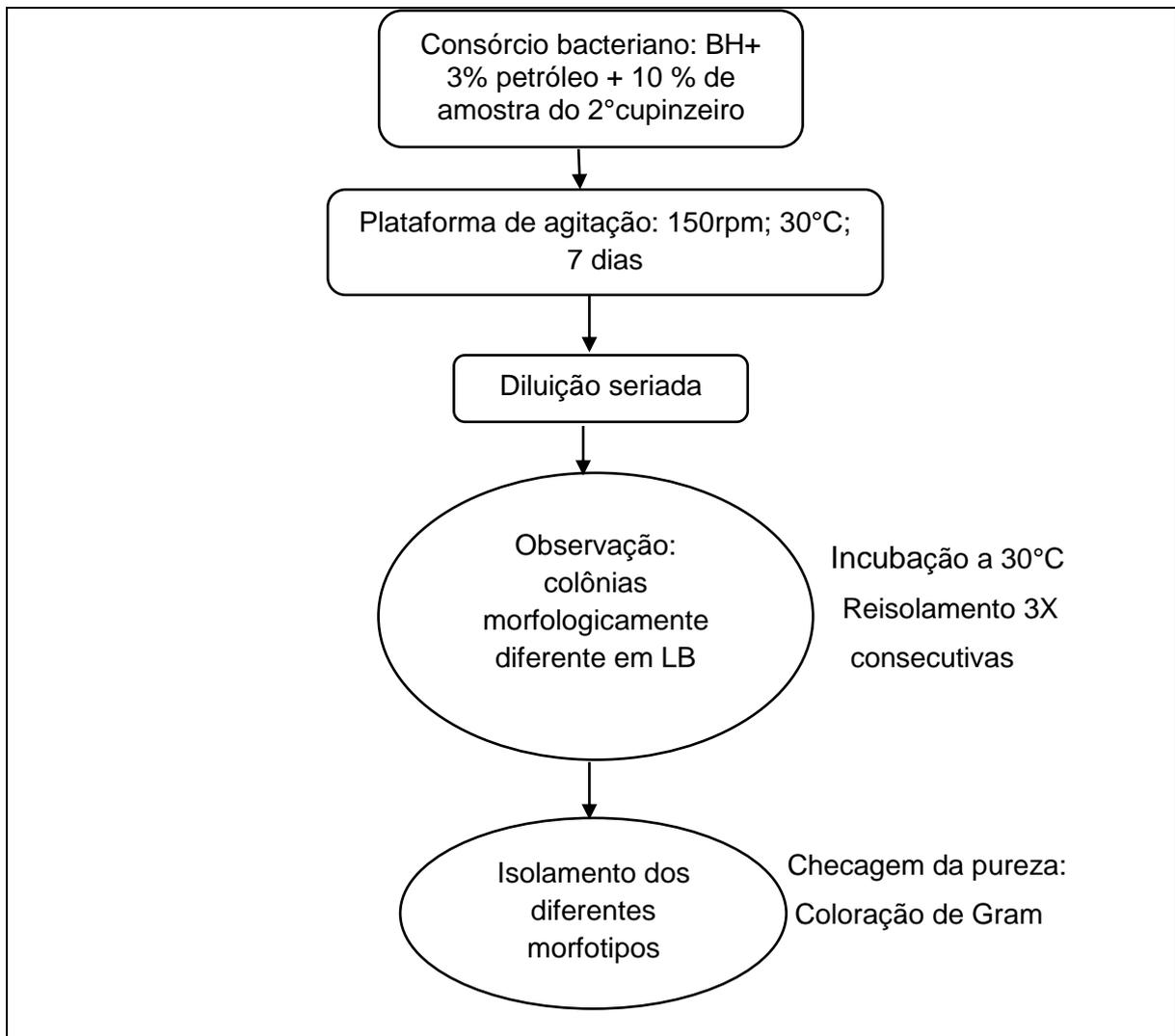


Figura 7. Protocolo experimental de obtenção de culturas puras

4.5 Enriquecimento de Culturas dos Morfotipos Isolados

Preparou-se em um Erlenmeyer o controle abiótico contendo 97 mL de BH mais 3% de petróleo e 9 Erlenmeyer de 250 mL, contendo em cada: 97 mL de BH, 3% de petróleo e inóculo. As colônias (morfotipos) selecionadas foram inoculadas em 5 mL de LB caldo (peptona 10 g/L, NaCl 10 g/L e extrato de levedura 5 g/L) em tubos de ensaio, com tampa rosqueável (10 mL) e incubadas por 24 horas a 30°C, sob agitação de 150 rpm. Para preparo do inóculo, foi retirado 1 mL da cultura do pré-inóculo, centrifugado por 3 minutos a 1000 rpm e descartado o sobrenadante. Após foram ressuspensas em 1 mL de meio BH estéril e um volume calculado foi inoculado nos Erlenmeyer, de modo a obter uma densidade celular de 0,01 a 600nm em 97 mL de meio BH contendo 3% de petróleo como fonte de carbono. Os cultivos

foram realizados sob agitação (150 rpm), em Erlenmeyer de 250 mL selados e incubados a 30°C durante 30 dias. As culturas foram monitoradas a cada 24h e as observações foram realizadas de acordo com o nível de transformação da camada oleosa e turbidez do meio. Este monitoramento teve como objetivo selecionar o morfotipo que prosseguiria com a pesquisa. Como controle abiótico um frasco contendo meio BH e petróleo foi mantido nas mesmas condições. Este procedimento e monitoramento da etapa descrita acima foram realizados no laboratório de Microbiologia do ISB/UFAM.

4.6 Caracterização Morfológica do Morfotipo Selecionado

A caracterização morfológica foi executada no laboratório de Microbiologia do ISB/UFAM. A mesma foi realizada durante o isolamento dos morfotipos, observando-se primeiramente nas colônias características como: pigmentação (cor da colônia), forma (a forma básica da colônia), elevação (altura e forma do ápice da colônia), margem (forma da borda da colônia) e odor (odor característico da colônia).

Outra etapa da caracterização morfológica foi executada mediante a Técnica de Coloração de Gram. Retirou-se uma amostra da colônia de bactérias da placa de Petri e esfregou-se sobre a lâmina em movimentos circulares. Este procedimento foi realizado sobre a chama do bico de Bunsen, a fim de secar e fixar a amostra. Em seguida utilizou-se o *kit* para coloração de Gram do fabricante (LB Laborclin). O esfregaço bacteriano foi tratado com os reagentes na seguinte ordem: o corante violeta de genciana por 1min, retirou-se o corante inclinando a lâmina, em seguida acrescentou-se a solução de lugol por 1min, e transcorrido o tempo utilizou-se a solução descolorante até a remoção de todo excesso de corante, após as lâminas foram lavadas em água corrente e posteriormente acrescentou-se o corante fucsina fenicada por 1min. Lavou-se novamente a lâmina para se retirar o excesso de corante. Após a coloração, as lâminas secaram a temperatura ambiente e as bactérias foram visualizada em microscópico óptico.

Para o teste de cápsula, com o auxílio de uma alça de platina, retirou-se a amostra de colônia bacteriana da placa de Petri e adicionou-se 2 µL de tinta nanquim. Realizou-se o esfregaço com a lamínula, posteriormente a lâmina foi corada com o método descrito acima e visualizada em microscópio óptico.

4.7 Identificação Molecular por Sequenciamento do Gene para 16S rRNA

A etapa de identificação molecular por sequenciamento do gene para 16S rRNA, foi realizada em colaboração com o laboratório de DNA, do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM), da Universidade Federal do Amazonas-UFAM.

4.7.1 Extração de DNA Genômico

Mediante a amostra previamente isolada e identificada, foi efetivada extração de DNA genômico, a partir do Método de Extração por Fenol/Clorofórmio (Sambrook e Russel 2001), com algumas modificações. Seguindo o protocolo, as células bacterianas foram inoculadas em 3 mL de caldo Luria-Bertani (LB), e deixadas para crescimento em incubadora (SHAKER S L 222, marca SOLAB), com agitação durante 24h a 30°C e 150 rpm. Após crescimento celular o material foi centrifugado a 12.000g por 2min, para concentração de células em sedimento, após a centrifugação descartou-se o sobrenadante.

Para a etapa de lise celular o sedimento foi ressuspenso em 300 µL de TEN (NaCl 100mM; EDTA 50nM; Tris-HCl 50mM com pH 8,0), adicionou-se 30 µL de enzima liozima (20mg/mL), incubou-se por 30min a temperatura ambiente. Adicionou-se 50 µL de Triton X-100 10% e aqueceu por 5min a 60°C, posteriormente a solução foi resfriada vagorosamente, deixando-a em temperatura ambiente.

Foi adicionado ao sistema 1 µL de RNase A (10 mg/mL) e incubou-se por 30min a 37°C. Posteriormente adicionou-se 0,1 V de SDS 10% e homogeneizou. Acrescentou-se 30 µL de proteinase K (10mg/mL) e incubou por 15min a 50°C. Após a incubação foi adicionado 1V de fenol e o material foi agitado manualmente por 5min e centrifugado em 12.000g por 2min a temperatura ambiente, recuperou-se a fase aquosa. Acrescentou-se a fase aquosa 1V de clorofane, novamente centrifugou-se a 12.000g por 2min, a temperatura ambiente e novamente a fase aquosa foi recuperada e acrescentada 1V de Clorofórmio, centrifugou-se a 12.000g por 2min, a temperatura ambiente. Para a recuperação da fase aquosa final foi adicionado 0,1V de NaCl 3M e vagorosamente 2,5 V de etanol 100% a -20°C. O DNA foi coletado com um bastão de vidro e hidratado com 1 mL de etanol 70%, foi deixado em repouso em fluxo laminar para secagem final por aproximadamente 15min.

Após secagem, foi ressuspenso com 500 µL de tampão R (Tris-HCl 10mM pH 7.5; EDTA 1mM), e logo em seguida armazenado por 24h a 4°C. Para

visualização do DNA foi feita eletroforese em gel de agarose 0,8% em seguida o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL).

4.7.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do gene 16S rRNA

Para amplificação do gene 16S rRNA, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores: 530 F (5'-TGA CTG ACT GAG TGC CAG CMGCCG CGG -3') e 1492R (5'-TGA CTG ACT GAG AGC TCT ACC TTG TTA CGM YTT-3'). A reação de PCR foi feita com volume total de 25 µL (2,5 µL de tampão 10X sem MgCl₂; 2,5 µL de MgCl₂ 25 mM; 2 µL de dNTPs 2,5 mM; 1 µL de iniciador forward 5 pmol/µL; 1 µL de iniciador reverso 5 pmol/µL; 0,3 µL de *Taq* DNA polimerase 5 U/µL, 14,7 µL de água e 1 µL DNA bacteriano em diferentes diluições). O sistema de amplificação foi realizado em aparelho termociclador (*Applied Biosystems, 96 Well*), com desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguido por 30 ciclos com desnaturação de 94°C por 40 s; anelamento dos iniciadores a 58°C por 40 s e extensão a 72°C por 2 min, seguido de extensão final de 72°C por 5 min e término da reação a 4°C por tempo indeterminado. Após a reação de amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% coradas com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo e fotografadas sob luz UV em fotodocumentador para verificação dos fragmentos 16S rRNA amplificados, tamanho e concentração aproximada. O marcador padrão utilizado para verificar o tamanho das bandas foi 1kb *ladder promega*.

Os produtos da PCR foram purificados a partir do gel de agarose, utilizando-se o *Kit Nucleic Acid and protein Purification* (Macherey-Nagel), seguindo as especificações do fabricante.

4.7.3 Sequenciamento da Região Gênica 16S rRNA

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados utilizando o *Kit Applied Biosystems*. Foram utilizados 5 µL (≅10ng/µL) de DNA purificado para cada iniciador. Em cada tubo de amostra, foi adicionado 5 µL de mix: 0,65 µL de cada oligonucleotídeo iniciador na concentração de 5,0 pmol/µL; 2 µL de tampão 5X [Tris-HCl 1M pH 9,0; MgCl₂ 1M]; 0,35 µL de *ABI BigDye*; e 2 µL de água deionizada estéril e filtrada. O volume final da reação de sequenciamento foi de 10 µL. A reação foi realizada em termociclador (*Applied Biosystems, 96 Well*) com a seguinte ciclagem: 1) desnaturação inicial de 96°C; 2) 16 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 s,

anelamento a 50°C por 15 s e extensão a 60°C por 75 s; 3) 6 ciclos de desnaturação a 96°C por 10s, anelamento a 50°C por 15s e extensão a 60°C por 90s; 4) 6 ciclos de desnaturação a 96°C por 10s, anelamento a 50°C por 15s e extensão a 60°C por 120s; 5) 10°C para finalizar.

Após a reação de sequenciamento foi feito a precipitação dos produtos seguindo o protocolo de etanol/EDTA, adicionando-se sobre este 32,5 µL de mix Etanol/EDTA (2,5 µL EDTA 125mM; 30 µL de Etanol 100%), em seguida o material foi agitado gentilmente por inversões de 3 a 4 vezes e deixado em repouso por 15 minutos. O material foi centrifugado durante 25 minutos em 2500rcf a 4°C. Imediatamente após a centrifugação, os poços foram invertidos sobre um papel para secagem e centrifugados por 1 minutos a 100 rcf. Posteriormente, foi adicionado 30 µL de etanol 70%, novamente o material será centrifugado por 15 minutos em 1450 rcf a 4°C. Imediatamente após a centrifugação, os poços foram invertidos sobre um papel para secagem e centrifugados por 1 minutos a 100 rcf. Em seguida o material foi deixado em estufa para secar por 15 minutos a 37°C e, logo após, foi ressuspendido em 10 µL de formamida e gentilmente vortexado. Em seguida o DNA foi desnaturado em termociclador a 95°C durante 1 minuto. Ao final as amostras foram submetidas à eletroforese capilar em sequenciador (3130XL-Applied Biosystems DNA sequence).

Essas sequencias geradas foram submetidas à análise por bioinformática para obtenção da tabela de qualidade de sequências, sequência *foward*, sequência *reverse* e sequências contigs, usando programa *Phred* e *Cap3*. As sequencias reverse-complementar foram obtidas usando suíte de manipulação de sequência disponível em: < <http://www.bioinformatics.org/>>. A identificação molecular foi feita a partir de alinhamento comparativo entre espécies usando-se a ferramenta *BLASTn*, assumindo-se o percentual de confiança para identidade bacteriana (ID) a partir de 100%.

4.8 Teste de Sensibilidade a Antibióticos

As etapas desenvolvidas nos itens (4.8, 4.10, 4.11 e 4.12), foram executadas em colaboração com o laboratório de Proteômica do Mini-Campus da Universidade Federal do Amazonas.

O teste de sensibilidade da amostra bacteriana a antibióticos foi realizado segundo as Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana (ANONYMOUS. NCCLS, 2005), adequando-se algumas condições ao micro-

organismo-teste. De uma placa de bactéria crescida por no máximo 24h, foram retiradas algumas colônias e ressuspendidas em solução salina 0,85% estéril. Mediu-se a densidade celular em espectrofotômetro 600nm e ajustou-se o volume da suspensão para 0,1 de absorbância (equivalente a 0,5 *McFarland*). Mergulhou-se um palito com algodão estéril nesta suspensão de células por alguns instantes e retirou-se o excesso pressionando na parede do tubo. Em seguida, inoculou-se em uma placa (140 mm de diâmetro) contendo meio Mueller-Hinton sólido (70 mL) por três vezes, girando a placa a 60° a cada esfregaço. A placa foi deixada em repouso por 3 minutos a fim de absorver o excesso de umidade. Em seguida com o auxílio de uma pinça, foi colocado uma unidade de multidiscos de antibióticos (Laborclin) sobre o meio de cultura, pressionando-o suavemente para assegurar contato completo. A placa foi incubada a 30°C por 24h. os halos foram medidos utilizando uma régua e considerou-se o halo de inibição a área sem crescimento detectável a olho nu. Os diâmetros dos halos foram interpretados como resistentes, resistência intermediária e sensíveis.

4.9 Perfil de Crescimento Bacteriano

A partir da amostra bacteriana preservada em BH semisólido acrescido de petróleo, com auxílio de uma alça de platina estéril, uma alçada de massa celular foi inoculada em 5 mL meio LB caldo em tubos de ensaio com tampa rosqueável (10 mL) e estes foram incubados por 24h, a 30°C, sob agitação de 150 rpm. Para preparo do inóculo, foi retirado 1 mL da cultura do pré-inóculo, centrifugado por 3min a 10000 rpm e descartado o sobrenadante. As células foram ressuspendidas em 1 mL de meio BH estéril e um volume necessário foi inoculado em 50 mL de meio BH estéril em erlenmeyer de 250 mL, de modo a obter uma densidade celular de 0,01 a 600nm. Ao meio foram adicionadas as fontes de carbono (petróleo 3% e LB 0,1%). Estes inóculos foram incubado em shaker (SHAKER S L 222, marca SOLAB) a 30°C, a 150 rpm. A densidade celular foi medida em aparelho espectrofotômetro (marca genesys 10 vis, fabricante Thermo scientific), a cada 24h por um período de 110 dias. O experimento foi realizado em quatro experimentos independentes.

A etapa acima descrita foi realizada em colaboração com os laboratórios de Microbiologia, Genética e Físico-Química do ISB/UFAM.

4.10 Atividade Emulsificante de Sobrenadante de Cultura Bacteriana

O inóculo bacteriano foi preparado como descrito para o perfil de crescimento bacteriano. No tempo de crescimento de 6 dias, o sobrenadante foi recuperado por centrifugação a 4000 rpm, a 4°C. Para o teste, 4 mL de sobrenadante foram adicionados em um tubo de vidro de rosca (15 x 150 mm). Sobre este, foram adicionados 4 mL de solvente orgânico. A mistura foi misturada vigorosamente por 5 minutos em vortex (QL- 901 Vertex) e deixada descansando. As medidas da altura da fase oleosa, aquosa e emulsificada foram medidas em 24h para obtenção dos índices de emulsificação. O índice de emulsificação foi calculado usando a fórmula: $E(\%) = He/Ht \times 100$, onde He é a altura da emulsão e Ht é a altura total. O experimento foi realizado em três experimentos independentes. Foram utilizados os substratos hidrofóbicos: hexano, xileno, e petróleo. Como controles de atividade emulsificante foi utilizado: meio de cultura a 0,5% de BH estéril, Triton X-100 e Tween 20, respectivamente (CAMACHO-CHAB et al., 2013).

4.11 Teste de Hidrofobicidade Celular

O inóculo bacteriano foi preparado como descrito para o perfil de crescimento bacteriano. No tempos de crescimento de 6 dias, as células foram recuperadas por centrifugação a 4000 rpm, a 4°C. As células recuperadas foram ressuspensas em meio BH estéril em uma densidade celular final de 0,5 a 600nm de comprimento de onda no aparelho espectrofotômetro. Deste volume, foi adicionado 1,2 mL em um tubo de vidro de 10 mL (13 x 100 mm). Em seguida, foram adicionados 500 µL de substrato hidrofóbico sobre a suspensão e misturada em vortex por 2 min (QL- 901 Vertex). Em seguida, os tubos foram deixados descansando por 1 h para a completa separação das fases. Após o tempo, toda a fase aquosa foi recuperada com auxílio de uma pipeta Pasteur. A absorbância da fase aquosa foi medida a 600nm de comprimento de onda usando cubeta de acrílico em um aparelho de espectrofotômetro (marca genesys 10 vis, fabricante Thermo scientific), tendo como o branco o meio BH estéril. A hidrofobicidade celular foi expressa como % de aderência celular no óleo, a qual foi calculada usando a fórmula: $BA(\%) = (1 - (Abs/0,5)) \times 100$, onde BA é aderência celular, Abs é a absorbância da suspensão após a agitação e 0,5 é a absorbância da suspensão antes da agitação. O experimento foi realizado em três experimentos independentes. Foram utilizados os solventes: hexano, xileno e petróleo (ISMAIL e DADASNIA, 2015).

4.12 Detecção de Produção de Biossurfactante

O inóculo bacteriano foi preparado como descrito para o perfil de crescimento bacteriano. No tempo de crescimento de 6 dias, foi recuperado a cultura bacteriana e deixada em overnight a 4°C para uma boa separação do óleo residual do sobrenadante. Com o auxílio de uma pipeta Pauster, a cultura foi separada do óleo e esta foi centrifugada por 3 minutos a 10.000 rpm para separação das células. O sobrenadante foi filtrado usando filtro de 0,20µm de tamanho de poro (Millipore). Foram retirados 135 µL do sobrenadante filtrado e aplicados sobre parafilme estendido sobre uma superfície para verificar a retenção da configuração de gota. As gotas foram feitas em triplicata e o experimento foi realizado em três experimentos independentes. Foram usados como controle: água destilada, SDS (doecil sulfato de sódio) a 0,1, 1,0 e 10% (modificado de JAIN *et al.*, 1991).

4.13 Tratamento Estatístico

Para análise, organização e obtenção da média e desvios-padrão dos dados para o perfil de crescimento microbiano utilizou-se o programa Microsoft Excel. Já para análise, organização e obtenção dos desvios-padrão dos dados de emulsificante e hidrofobicidade celular, utilizou-se o programa Microsoft Excel e para verificação de diferença ao nível de 5% de significância, utilizou-se One-Way ANOVA do programa Past 3.12, disponível no site <http://folk.uio.no/ohammer/past/>, e o Teste Tukey do programa Mypstat disponível no site <http://systatsoftware.com/downloads/downloads-mypstat>.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação dos Isópteros

Os térmitas oriundos do cupinzeiro A2 (Tabela 3) foram identificados como pertencentes ao reino Animalia, divisão Arthropoda, classe Insecta, ordem Isóptera e família Termitidae.

Os cupins foram identificados de acordo com as características morfológicas específicas a cada família. De acordo com Constantino (2012), os cupins pertencentes a família Termitidae, possuem fontanela, esporões apicais da tíbia, mandíbula esquerda com um ou dois dentes marginais, asas não reticuladas (reprodutores), escama alar posterior não recobrindo a anterior e pronoto em forma de sela, com um lobo anterior bem definido (Figura 8).



Figura 8. Identificação dos térmitas oriundos do cupinzeiro A2

A família Termitidae é a maior e mais diversa dentre as 7 famílias reconhecidas atualmente, de ampla ocorrência principalmente na América do Sul. Uma característica que ocorre somente nesta família é a relação de mutualismo (térmitas, fungos e bactérias), podendo assim, receber a denominação de cupins superiores. Portanto, a “capacidade de alimentar-se de material lignocelulósico” se deve a esta relação. Já as demais famílias (cupins inferiores), alimentam-se de material vegetal devido a relação entre cupins e fungos somente (CONSTANTINO, 2012).

Além da relação interespecífica que ocorre com os isópteros pertencentes a família Termitidae, outro fator que merece destaque, é a compartimentalização do intestino desses insetos. Tendo em vista que esta especialidade lhes confere tolerância a um amplo gradiente de condições físico-química, tais como pH e oxigênio dissolvidos, esta particularidade é fundamental para abrigar em seu intestino uma enorme variedade de microrganismos. Estes aspectos são essenciais para a sobrevivência dos térmitas, por estes serem fontes de diversas enzimas necessárias para degradar o material vegetal (THONGARAM *et al.*, 2005).

Dentre os constituintes da madeira encontram-se a celulose, hemicelulose e a lignina. Contudo, a complexidade química dos referidos compostos é bem diferente, a celulose é menos complexa que hemicelulose, que por sua vez é menos complexa que lignina, sendo esta, o segundo componente mais abundante da biomassa vegetal. De acordo com Brown e Chang; (2013), ela é um heteropolímero aromático altamente complexo e recalcitrante. Contudo, alguns microrganismos desenvolveram meios enzimáticos que possibilitam despolimerizá-la.

Deste modo, pesquisas relacionadas afirmam que a degradação microbiana da lignina é um processo complexo e que envolve a atuação de várias enzimas. Relataram também que bactérias podem reagir com a lignina e possivelmente produzir compostos aromáticos menores (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPAs) que podem ser importados a célula para o catabolismo (BROWN e CHANG; 2013). Contudo, no que se refere aos HPAs, sabe-se que são compostos altamente recalcitrantes. Portanto, consoante as analogias entre a lignina e os HPAs, o potencial de bactérias oriundas de isópteros quanto a degradação do petróleo foi avaliada.

Ainda devemos ressaltar pesquisas que correlacionam a degradação microbiana de xenobióticos como bifenilo e HPAs com a da lignina. Estas afirmam que se a degradação biocatalítica da lignina puder ser aproveitada e controlada, este polímero representa uma importante fonte de produtos biológicos aromáticos e fenólicos. Deste modo, seriam matérias-primas valiosas, além da síntese de produtos químicos. Portanto, há um interesse a mais em localizar microrganismos com potencial para degradar tanto os HPAs como a lignina, já que ambos são compostos aromáticos e recalcitrantes. Neste contexto, a busca por microrganismos com potencial para degradar HPAs são extensivamente pesquisados (BROWN e CHANG; 2013).

5.2 Seleção de Bactérias que Utilizam Petróleo como Fonte de Carbono e Energia

Após o monitoramento por 30 dias, os consórcios microbianos apresentaram capacidade variável quanto a degradação de petróleo, sendo este a única fonte de carbono (Tabela 4). Cada consórcio é indicado pelas iniciais ConsA1, ConsA2, ConsA3, ConsS1, ConsS2 e ConsS3 seguido da identificação do cupinzeiro A ou S, de origem arborícola ou solo, respectivamente. Durante as observações, utilizou-se o

símbolo de adição (+) para indicar o nível de transformação da camada oleosa, bem como o nível de turbidez do meio em relação ao controle abiótico.

Tabela 4. Capacidade de crescimento microbiano em meio contendo petróleo como única fonte de carbono e energia

Identificação dos consórcios	Intervalos em dias							Resultados em 15 dias de cultivo	
	1	5	10	15	20	25	30	Transformação da camada oleosa	Turbidez do meio de cultura
ConsA1	+	++	++	+++	+++	+++	+++	Alta	Muito
ConsA2	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	Alta	Muito
ConsS1	-	+	+	++	++	++	++	Média	Médio
ConsA3	-	+	+	++	+++	+++	++	Média	Médio
ConsS2	-	-	+	+	+	++	++	Baixa	Baixo
ConsS3	-	-	+	+	++	++	++	Baixa	Baixo

(-) sem alteração da na camada oleosa; (+) baixo nível de transformação na camada oleosa; (++) nível médio de transformação; (+++) alto nível de transformação.

Consoante os resultados da Tabela 4, verificou-se que de forma geral os 6 consórcios microbianos possuem microrganismos capazes de crescerem em meio contendo petróleo como única fonte de carbono e energia. Porém, os fatores determinantes para a seleção se deve aos resultados observados na transformação da camada oleosa, bem como a turbidez do meio de cultura relacionadas ao tempo, ambas as característica estão relacionadas ao crescimento microbiano.

Segundo Tortora *et al.*, (2012), normalmente o meio de enriquecimento é líquido e contém todos os nutrientes necessários para favorecer a multiplicação da bactéria de interesse. No entanto, ele apresenta a característica especial para estimular o crescimento do organismo de importância, que poderá estar em baixo número, tornando possível sua detecção. Portanto, o meio de cultura líquido (BH+ 3% de petróleo) utilizado nos testes, continham apenas petróleo como única fonte de carbono e energia. Conseqüentemente, nessas condições, os microrganismos incapazes de utilizar tal nutriente não cresceram.

De acordo com a (Tabela 4), os consórcios consA1 e consA2 apresentaram turbidez e transformação da camada oleosa máxima após 15 dias de cultivo. Os demais consórcios, ainda que capazes de utilizar petróleo como fonte de carbono, apresentaram níveis inferiores quando comparados aos consórcios consA1 e consA2. Assim, considerou-se para etapas subsequentes o consórcio consA2, por

apresentar ótimo crescimento microbiano, bem como alto nível de transformação da camada oleosa. Logo, este consórcio foi utilizado para realizar a identificação das bactérias integrantes.

5.3 Obtenção de Culturas Puras a partir do Consórcio ConA2

A partir do consórcio ConA2 foram obtidos 9 morfotipos, de acordo com os aspectos das colônias, quando o consórcio foi cultivado em placas de Petri contendo meio LB (Tabela 5). Foram inicialmente denominados por A2A, A2B, A2C, A2D, A2E, A2F, A2G, A2H e A2I. Para a realização desta etapa, utilizou-se uma lupa para observar as características da colônia como: pigmentação (cor da colônia), forma (a forma básica da colônia), elevação (altura e forma do ápice da colônia), margem (forma da borda da colônia) e odor (odor característico da colônia). Segundo (TORTORA *et al.*, 2005) as colônias bacterianas, bem como as células podem se apresentar de vários tamanhos e diferentes formas. Deste modo, estas características podem ser empregadas no diferenciamento morfológico das colônias bacterianas.

5.4 Enriquecimento de Culturas dos Morfotipos Isolados do Consórcio consA2

Foram realizados monitoramento em um período de 30 dias, acerca do crescimento dos morfotipos isolados. Durante as observações, utilizou-se o símbolo de adição (+) para indicar o nível de transformação da camada oleosa, bem como o nível de turbidez do meio em relação ao controle abiótico (Tabela 5).

Tabela 5. Resultado do teste de enriquecimento dos morfotipos isolados do consórcio ConsA2

Denominação dos Morfotipos isolados de ConsA2	Características Morfológicas	Intervalos em dias						Resultados em 15 dias de cultivo		
		1	5	10	15	20	25	30	Transformação da camada oleosa	Turbidez do meio
A2A	Colônias: grandes, bordas irregulares, coloração branco leitoso, sem relevo, sem brilho e aspecto úmido	-	-+	+	+	++	++	++	Média	Médio
A2B	Colônias: médias, bordas irregulares, coloração branco leitoso, sem relevo, sem brilho e aspecto seco	+	+	+++	+++	++	+++	+++	Alta	Alto
A2C	Colônias: médias, bordas regulares, coloração amarelo claro, com relevo, sem brilho e aspecto úmido	-	-+	+	++	++	++	++	Média	Médio
A2D	Colônias: médias, bordas regulares, coloração amarelo leitoso, com relevo, sem brilho e espalhadas	-	-+	+	++	++	++	++	Média	Médio
A2E	Colônias: pequenas, bordas regulares, coloração amarelo escuro, com relevo, com brilho e aspecto úmido	-	-+	+	++	++	++	++	Média	Médio
A2F	Colônias: pequenas, bordas regulares, coloração branca, com relevo, com brilho e aspecto úmido	-+	+	++	++	++	++	++	Média	Médio
A2G	Colônias: grandes, bordas irregulares, coloração amarelada, com relevo, brilho e aspecto úmido	-	-+	+	++	++	++	++	Média	Médio
A2H	Colônias: médias, bordas regulares, coloração amarelada, com relevo, com brilho e aspecto úmido	-+	+	+++	+++	++	+++	+++	Alto	Meio muito turvo
A2I	Colônias: médias, bordas regulares, coloração branca, com relevo, brilho e aspecto úmido	-+	+	+++	+++	++	+++	+++	Alto	Meio muito turvo

(-) sem alteração da na camada oleosa; (-+) traço nível de transformação na camada oleosa; (+) baixo nível de transformação na camada oleosa; (++) nível médio de transformação; (+++) alto nível de transformação da camada oleosa.

Consoante os resultados encontrados na Tabela 5, podemos inferir que no tempo de 15 dias de cultivos os morfotipos A2B, A2H e A2I, apresentaram alto nível de transformação da camada oleosa e meio muito turvo em relação ao controle

abiótico. Portanto, pelo fato destes terem apresentado alto crescimento microbiano em tais condições (petróleo como única fonte de carbono), provavelmente, são capazes de degradar estes substratos. Contudo, selecionou-se o morfotipo A2H para prosseguir com as análises, embasado em seu alto nível de crescimento no meio seletivo utilizado. (Figura 9).

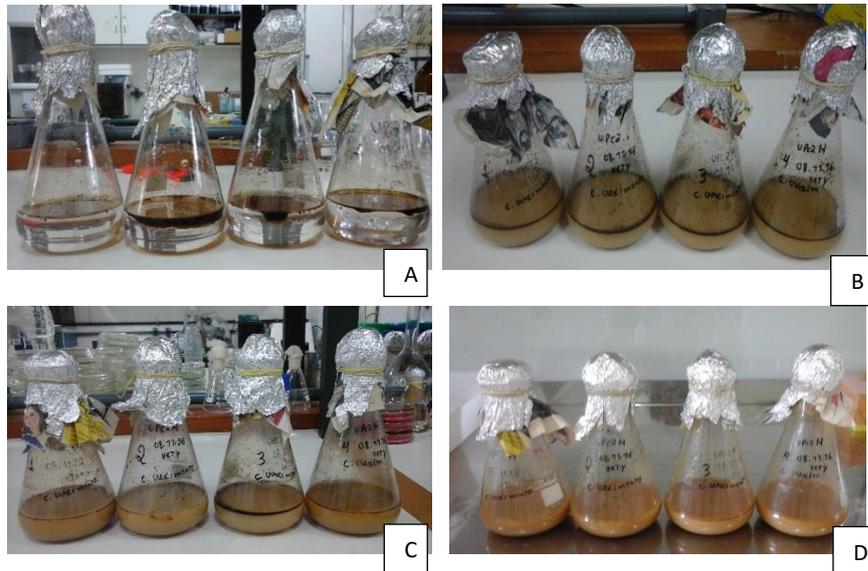


Figura 9. Crescimento de A2H em meio líquido contendo petróleo como única fonte de carbono A= tempo 0 de crescimento microbiano, B= 10 dias de crescimento, C= tempo 25 dias de crescimento e D= 50 de crescimento

5.5 Caracterização Morfológica e Identificação Molecular de A2H

Para a realização da caracterização morfológica de A2H utilizou-se lupa e microscópio óptico em aumento de 1000x (Tabela 5) e (Figura 10).



Figura 10. Caracterização morfológica de A2H
A= caracterização de colônia; B= classificação de Gram; C= teste de cápsula

A identificação molecular procedeu a partir da amplificação usando os primers 530F e 1492R e tratamento da sequência, obteve-se um fragmento de 444 pb (Figura 11). O alinhamento desta sequência no banco de dados NCBI, usando programa BLASTn, mostra que a linhagem A2H tem 100% de identidade, e-value 0.0 e Query Cover 100% para *Enterobacter cloacae* (Anexo A).

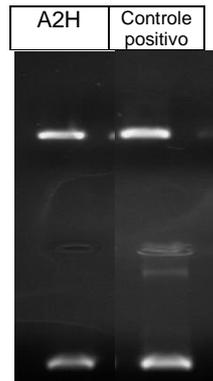


Figura 11. Gel da PCR de A2H

Tabela 6. Caracterização morfológica e identificação molecular de A2H

Denominação Inicial	Caracterização Morfológica	Características Microscópica	Teste de Cápsula	Identificação Molecular
A2H	Colônias: médias, bordas regulares, coloração amareladas, com relevo, com brilho e aspecto húmido.	Gram: Negativa Forma: bacilos Arranjo: isolados	Encapsulada	<i>Enterobacter cloacae</i>

A caracterização morfológica de colônias é considerada uma etapa inicial muito importante na identificação de microrganismos isolados. Estudos afirmam que a maioria das observações iniciais dos microrganismos é feita através de preparações coradas, como a coloração de Gram. Esta técnica fundamenta-se no fato de que diferentes tipos de bactérias reagem de modo distinto aos corantes, devido as diferenças estruturais na parede celular. Portanto, este método é responsável pela retenção ou a liberação de uma combinação de corantes. Contudo, a bactéria em análise apresenta-se em forma de bacilo, Gram negativa, ou seja, ela não apresenta a propriedade de reter os corantes, por que sua parede celular possui apenas uma fina camada de peptidoglicano (dissacarídeos e aminoácidos).

No teste de cápsula observou-se a presença desta estrutura. Pesquisas apontam que existe maior probabilidade das bactérias Gram negativas possuírem este componente e a presença deste pode lhes conferir vantagens como: proteção a desidratação, proteção ao ataque de bacteriófagos, favorece a aderência ao substrato e evita que nutrientes se movam para fora da célula (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

A capacidade de aderir-se ao substrato, bem como a liberação da célula microbiana a superfície é uma das mais importantes estratégias de sobrevivência dos microrganismos, é sua habilidade em colonizar um nicho ecológico onde possa

se multiplicar. Portanto, a presença da cápsula em uma célula microbiana é muito importante, já que ela contribui significativamente para sobrevivência do microrganismo em ambientes não favoráveis, como aqueles que possuem petróleo como única fonte de carbono.

Segundo Abdel-El-Haleem (2003), algumas proteínas podem estarem ligadas a cápsula para formarem complexos com atividade emulsificante. A produção de biossurfactante é visto como um mecanismo que facilita a absorção de nutrientes hidrofóbicos, ou seja, ele torna os nutrientes mais disponíveis ou mais solúveis, além de evitar o contato direto com o envelope nuclear. Conseqüentemente, é possível que a presença desta estrutura na bactéria analisada (A2H) tenha potencializado sua ação quanto a degradação de petróleo.

Na etapa de identificação molecular por sequenciamento do gene para rRNA 16S, constatou-se que se tratava da espécie *Enterobacter cloacae*. De acordo com as análises laboratoriais desenvolvidas a cerca deste microrganismo, a *E. cloacae* apresentou ótimo crescimento em meio de cultura contendo petróleo como única fonte de carbono e energia. Portanto, há evidências de seu potencial quanto a degradação do petróleo.

Segundo khorasani *et al.*, (2013), esta espécie apresenta capacidade para degradar mazute (óleo diesel), petróleo, bem como outros compostos recalcitrantes. De acordo com Ahmed & Alzubaidi e Hamza (2014), a *E. cloacae* possui competência para degradar óleo bruto presente em água contaminada, uma vez que em seus estudos verificaram a redução de $\pm 40\%$ deste composto, incluindo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).

5.6 Teste de Susceptibilidade a Antimicrobianos de *Enterobacter cloacae*

Os resultados do teste a sensibilidade a antibióticos para *E. cloacae* (Figura 12), encontram-se na Tabela 7. Os dados foram obtidos mediante a mensuração dos tamanhos dos halos contido nas placas de Petri as quais continham crescimento bacteriano e multidiscos negativos com os antibióticos e suas respectivas concentrações: cefoxitina 30 μg , amoxicilina 30 μg , cefuroxima 30 μg , cefatotina 30 μg , ampicilina 10 μg , meropenem 10 μg , ceftazidima 30 μg , cefepima 30 μg , ciprofloxacina 5 μg , sulfametoxazol + trimetopim 25 μg , amicacina 30 μg , gentamicina 10 μg .

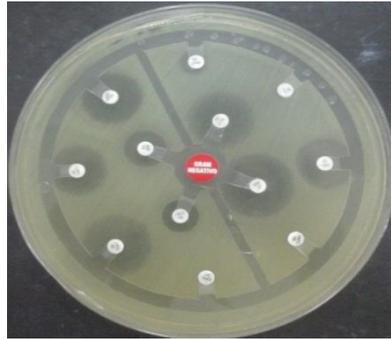


Figura 12. Teste de sensibilidade a antibióticos de *E. cloacae*

Tabela 7. Teste de sensibilidade a antibióticos de *E. cloacae*

Ordem	Antibiótico	Concentração (µg/disco)	Sigla	Halos obtidos (mm)	Resultado	Parâmetros para resultados			Classe de antibióticos
						Resistente (R)	Intermediário (I)	Sensível (S)	
01	Cefoxitina	30	CFO	0	R	≤ 14	15-17	≥ 18	Cefalosporinas 4 ^o geração
02	Amoxicilina	30	AMC	0	R	≤ 13	14-16	≥ 17	Penicilinas
03	Cefuroxima	30	CRX	22	S	≤ 14	15-17	≥ 18	Cefalosporinas 2 ^o geração
04	Cefalotina	30	CFL	0	R	≤ 14	15-17	≥ 18	Cefalosporinas 2 ^o geração
05	Ampicilina	10	AMP	11	R	≤ 13	14-16	≥ 17	Penicilinas
06	Meropenem	10	MER	29	S	≤ 13	14-15	≥ 16	Carbapenens
07	Ceftazidima	30	CAZ	25	S	≤ 17	18-20	≥ 21	Cefalosporinas 3 ^o geração
08	Cefepima	30	CPM	29	S	≤ 14	15-17	≥ 18	Cefalosporinas 4 ^o geração
09	Ciprofloxacina	5	CIP	28	S	≤ 15	16-20	≥ 21	Quinolonas
10	Sulfametoxazol + trimetopim	25	SUT	22	S	≤ 10	11-15	≥ 16	Inibidores da via metabólica do folato
11	Amicacina	30	AML	16	I	≤ 14	15-16	≥ 17	Aminoglicosídeo
12	Gentamicina	10	GEN	14	I	≤ 12	13-14	≥ 15	Aminoglicosídeo

Observou-se mediante o teste de sensibilidade a antibióticos que a espécie *E. Cloacae* é resistente a mais de um princípio ativo, (cefoxitina, amoxicilina e cefatotina), esta característica significa que as cepas não são inibidas pelas

concentrações destes agentes antimicrobianos (30µg, 30µg, 30µg respectivamente). Entretanto, ela apresenta sensibilidade intermediária aos antibióticos (amicacina 30µg e gentamicina 10µg). Por fim, ela se mostrou suscetível aos antibióticos nas respectivas concentrações (cefuroxima 30µg, meropenem 10µg, ceftazidima 30µg, cefepima 30µg, ciprofloxacina 5µg e sulfametoxazol+trimetopin 25µg).

5.7 Perfil de Crescimento Bacteriano

A curva de crescimento de *E. cloacae* foi obtido para as quatro condições de cultivos, de acordo com o método descrito no item 4.9 (Figura 13), ou seja, utilizou-se os valores reais dos 4 frascos de cultivo, deste modo, aparecem 4 curvas independentes. Entretanto, se analisarmos as curvas, podemos perceber que elas corroboram um mesmo padrão referentes as fases de crescimento, ou seja, a fase de aclimação ocorreu até o 3 dia de cultivo. A fase exponencial ocorreu a partir do 4° ao 10° dia. A estacionária começou no 11° dia com término no 100° dia. Por fim a fase de declínio ocorreu a partir do 101° dias. Os valores das absorbâncias obtidas no decorrer do teste poderão ser encontrados em (Anexos B).

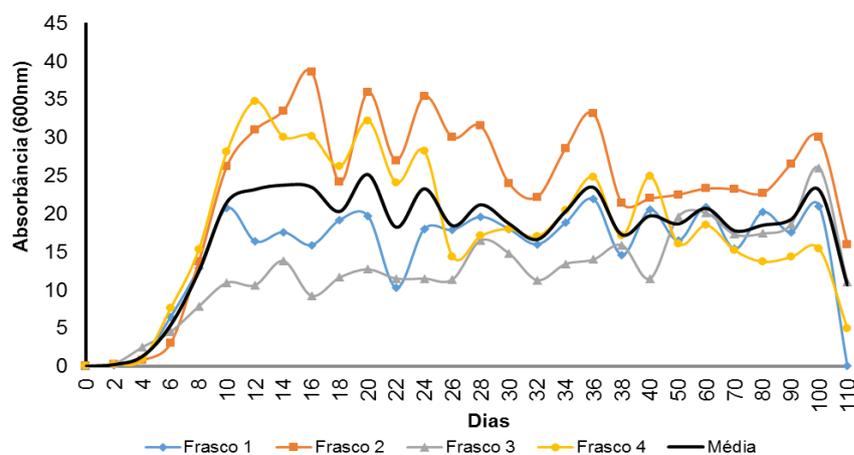


Figura 13. Curva de crescimento de *E. cloacae*

Estudos abordam que a maioria das bactérias apresentam maior crescimento microbiano em meios que apresentem pH neutro e temperatura de 30°C. Entretanto, de acordo com a temperatura ótima para o crescimento microbiano, podemos classificá-los em três grupos: psicrófilos, são assim classificados os microrganismos que apresenta crescimento ótimo em temperaturas baixas; mesófilos, estes crescem em temperatura moderada; e os termófilos, que crescem em temperatura elevadas. Assim, a *E. cloacae* pertence ao grupo dos mesófilos (TORTORA *et al.*, 2012).

Estudos abordam basicamente a existência de quatro fases de crescimento: a *lag*, a *log*, a fase estacionária e a fase de morte celular. Segundo Tortora *et al.*, (2012), na fase de aclimatação (*lag*) o número de célula sofre pequenas variações, pois a bactéria não se reproduz imediatamente. Conseqüentemente, neste período ocorre pouca ou nenhuma divisão celular, isto é, as células se encontram em estado de latência. Entretanto, a população está em um período de intensa atividade metabólica, principalmente na síntese de enzimas e moléculas variadas.

Na fase exponencial (*log*) a reprodução celular encontrava-se extremamente ativa, e o tempo de geração atinge um valor constante, ela é caracterizada como a fase de maior atividade metabólica da célula. Na fase estacionária também denominada de fase de equilíbrio, a velocidade de crescimento diminui, ou seja, o número de morte celular é equivalente ao número de células novas e a população se torna estável. No entanto, não se conhece exatamente os motivos que induzem a fase exponencial a diminuir suas atividades. Diversos fatores poderiam ser importantes razões, como o término de nutrientes, o acúmulo de produtos metabólicos tóxicos, assim como mudanças no pH danosas para a célula (TORTORA *et al.*, 2012).

Por fim, de acordo com Tortora *et al.*, (2012), na fase de declínio há o acúmulo adicional de produtos metabólicos inibitórios e depleção dos nutrientes essenciais, devido a estes fatores a taxa de morte é acelerada, ou seja, o número de células mortas excede o número de células novas. Contudo, esta fase continua até que a população tenha diminuído para uma pequena fração da população da fase anterior, ou até que tenha desaparecido totalmente.

5.8 Atividade Emulsificante de Sobrenadante de Cultura Bacteriana de *Enterobacter cloacae*

Os teste de emulsificante de sobrenadante da cultura bacteriana foi realizado no sexto dia de cultivo, dentro da fase exponencial e os resultados poderão ser encontrados em Anexos C. De acordo com o teste de Tukey, há diferença significativas entre os experimentos hexano e xileno; xileno e petróleo, como demonstra a Tabela 8 e Figura 14.

Tabela 8. Resultados do teste Tukey para atividade emulsificante de sobrenadante de *E. cloacae*

Soventes	Hexano (p-Value)	Xileno (p-Value)	Petróleo (p-Value)
Hexano		0,0001293	0,9968
Xileno	10,23		0,0001292
Petróleo	0,1099	10,34	

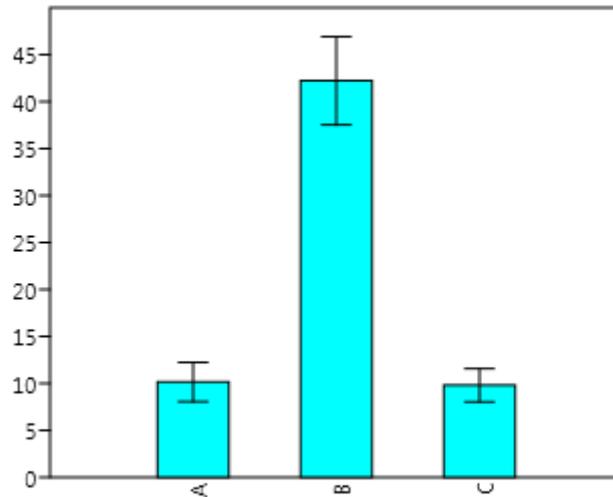


Figura 14. Atividade Emulsificante de Sobrenadante de *E. cloacae*
A=hexano, B= xileno, C= petróleo

De acordo com Ron e Rosenberg, (2002) a produção de emulsificante por uma dada espécie é potencializada na fase exponencial e para ocorrer a produção desta substância, faz-se necessário que o microrganismo esteja em contato com um óleo. Deste modo, o experimento foi realizado na referida fase, objetivando detectar o processo de emulsificação do petróleo (Figura 15). Contudo, as substâncias presentes no meio de cultura não se misturam (água e petróleo). Portanto, a função dos emulsificantes é justamente misturar substâncias imiscíveis, devido sua característica anfipática.



Figura 15. Teste de atividade emulsificante de sobrenadante de cultura de *E. cloacae*

De acordo com os resultados do teste de emulsificante (Anexo C), bem como a (Fig. 15), podemos perceber que houve a produção de emulsificante nos experimentos, se comparados aos controles positivo e negativo. Segundo Ron e Rosenberg (2002), o petróleo é um óleo composto por diferentes tipos de hidrocarbonetos (cadeia curta, cadeia longa, hidrocarbonetos aromáticos e policíclicos), todos estes apresentam baixa solubilidade em água. Conseqüentemente, são necessários meios biológicos que permitam um maior contato com esses hidrocarbonetos. Uma estratégia biológica visando aumentar o contato entre a bactéria e estes compostos insolúveis é a emulsificação dos hidrocarbonetos. Desde modo, não é surpreendente que as bactérias que crescem na presença de petróleo, seja geralmente um emulsificador potente. Assim sendo, os emulsificantes ajudam na dispersão do óleo, aumentam a área superficial para o crescimento, além de ajudarem a liberar a bactéria da gota de óleo após a sua utilização. Portanto, eles são adicionados ao meio contaminado, objetivando estimular o processo de biorremediação.

5.9 Hidrofobicidade Celular

Os testes referente a hidrofobicidade celular de *E. cloacae*, foram realizados no sexto dia de cultivo, dentro da fase exponencial e os resultados poderão ser encontrados em (Anexos D). De acordo com o teste de Tukey, não há diferença significativas entre os experimentos como mostra a Tabela 9 e a Figura 16.

Tabela 9. Resultados do teste Tukey de *E. cloacae* referente a sua hidrofobicidade celular

Soventes	Hexano (p-Value)	Xileno (p-Value)	Petróleo (p-Value)
Hexano		1	0,6714
Xileno			0,6695
Petróleo	1,213	1,218	

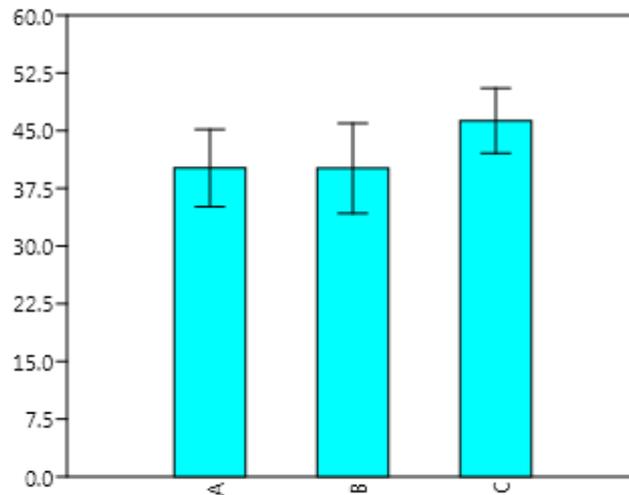


Figura 16. Hidrofobicidade Celular de *E. cloacae*
A=hexano, B= xileno, C= petróleo

O hexano é um solvente de caráter apolar, assim como o xileno. Por outro lado, o petróleo não é uma substância pura. Entretanto, a maioria de seus componentes são de caráter também apolares. Os resultados do teste demonstram que não houve diferença significativa entre os experimentos (Fig. 16). Segundo Obuekwe *et al.*, (2009), a hidrofobicidade celular pode ser compreendida como uma afinidade da superfície celular a contaminantes orgânicos apolares. Desde modo, os microrganismos podem aumentar sua hidrofobicidade celular, objetivando uma maior interação com a fonte de carbono e energia, como no caso do petróleo.

5.10 Resultados do Teste de Produção de Biossurfactante

Os teste de produção de biossurfactante, foi executado no sexto dia de cultivo, dentro da fase exponencial. Para verificação da produção de biossurfactante, realizou-se testes qualitativos e os experimentos realizados foram comparados com o SDS a 0,1%, 1% e 10 (Figura 17). Podemos inferir que a produção de biossurfactante por *E. cloacae* na presença de petróleo foi aproximadamente de 0,1%.

Água Destilada	Exp.1	Exp.2	Exp.3	SDS 0,1%	SDS 1%	SDS 10%
-------------------	-------	-------	-------	----------	--------	---------

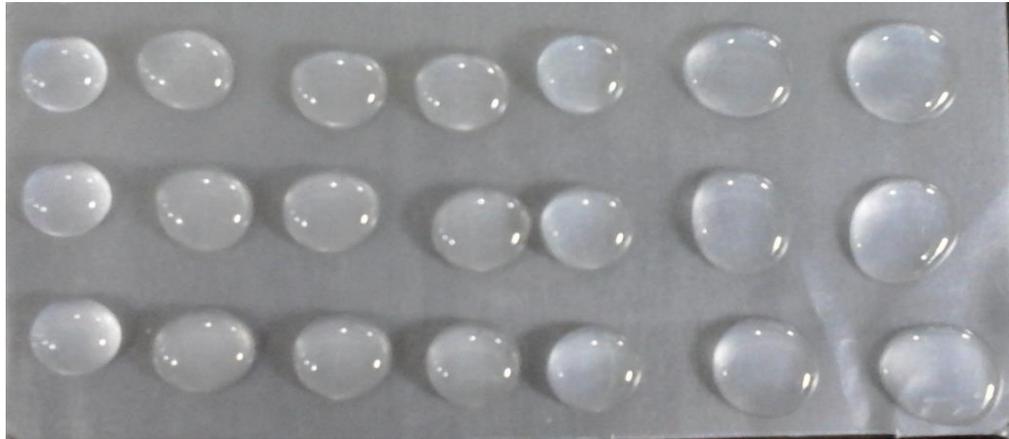


Figura 17. Produção de biossurfactante por *E. cloacae*
Exp= experimental. SDS= doecil sulfato de sódio

De acordo Lawniczak *et al.* (2013), a presença de biossurfactante aumenta o potencial de biorremediação de uma dada espécie. Contudo, a produção de biossurfactante por *E. cloacae* é pouco mencionada na literatura. Todavia, mediante testes qualitativos do sobrenadante da cultura bacteriana, verificou-se a produção de 0,1% de biossurfactante por esta espécie. Deste modo, por se tratar de uma espécie produtora de surfactante, houve uma motivação adicional para testá-la, uma vez que em processos de biorremediação são necessárias pouca quantidade de surfactantes.

A literatura afirma que a produção de biossurfactante por uma determinada espécie é potencializada durante a fase exponencial do crescimento do microrganismo. Desde modo, o teste para detectar a produção de biossurfactante, foi realizada dentro da referida fase. Estudos evidenciam que a presença de biossurfactante, está associada geralmente à utilização de substratos insolúveis em água, afim que fiquem disponíveis à célula microbiana. Em outras palavras, este composto tem a função de aumentar a disponibilidade de substâncias de natureza oleosa (como é o caso petróleo), afim deste ser utilizado pela célula, como fonte de carbono e energia.

Estudos relacionados recomendam o uso de biossurfactante, pois ele possuem vantagens frente aos surfactantes sintéticos, uma vez que são biodegradáveis, além de serem menos tóxicos e conseqüentemente, mais ecológicos. Portanto, Todos esses traços relevantes contribuem para uma alta aplicabilidade de biossurfactantes em vários ramos da indústria (ou seja, agricultura,

cosméticos, aditivos alimentares, produtos farmacêuticos). Contudo, sua maior aplicação está relacionada às indústrias petroquímicas, como na recuperação melhorada do petróleo (MEOR). Entretanto, o alto custo para a produção de biossurfactantes acaba sendo um fator negativo (SOBERÓN e MAIER, 2011; BANAT, *et al.*, 2010; MAKKAR e ROCKNE, 2003).

6. CONCLUSÃO

Tendo em vista que os cupins superiores alimentam-se de material lignocelulósico, esta capacidade se deve ao fato de relações simbióticas com fungos e bactérias. Sabe-se que a lignina e os HPAs são composto aromático altamente complexos e recalcitrantes. Consequentemente, de acordo com as analogias destes compostos, o potencial degradador de bactérias oriundas de térmitas quanto a degradação do petróleo foi confirmada. Verificou-se mediante testes laboratoriais, bem como resultados encontrados na literatura, que a bactéria *Enterobacter cloacae* isolada de amostras de cupins possui competência para degradar petróleo, bem como outros compostos recalcitrantes, além da evidências de produção de bioemulsificantes e biossurfactantes por esta espécie. Portanto, a *E. cloacae* é uma microrganismo promissor em processos relacionados a remediação de áreas impactadas por petróleo.

REFERÊNCIAS

- Abdel-El-Haleem, D.; *Acinetobacter*: environmental and biotechnological applications. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 71-74, 2003.
- AHMED, A. W.; ALZUBAIDI, F. S.; HAMZA, S. J.; Biodegradação de petróleo bruto em água contaminada por isolados locais de *Enterobacter cloacae*. **Jornal iraquiano de ciências**. Bagdá-Iraque, v.55, n. 3, p. 1025-1033, 2014.
- ALEXANDER, M. **Introduction to Soil Microbiology**. 12^a ed. New York: John Wiley & Sons, 1994.
- ALEXANDER. M. **Biodegradation and Bioremediation**. 2. ed. New York: AP Academic Press, 1999.
- ANDRADE, J. de A.; AUSGUSTO, F.; JARDIM, I.C.S.F. **Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados**. Eclética Química, n.35 (3), p.17-43, 2010.
- ANTAQ- Agencia Nacional de transporte Aquaviarios. **Indicadores do transporte de Cargas tonelada útil transportada (t) e tonelada quilômetro útil (TKU) 2012-ANTAQ**. p.50. Brasília. 2013.
- BAIRD, C. **Química ambiental**. 2^o ed. Porto Alegre: Bookman. 2002.
- BAKER. K. H.; HERSON. D. S. **Bioremediation**. Harrisburg: McGraw-Hill.1994.
- BAMFORTH. S.; SINGLETON. I.; **Bioremediation of polycyclicaromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Sussex, v.80, n. 7, p. 723-736, 2005.
- BANAT, I. M. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Appl Microbiol Biotechnol**. V. 87, p.427–444. 2010.
- BAZALEL, L. et al. **Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus***. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. p. 292-295. 1996.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- BORNEMAN, J. et al. **Molecular microbial diversity of an agricultural soil in wisconsin applied and environmental microbiology**. Washington. V.62. n.6, p.935-43, 1996.
- BRADY, J.E.; HUMISTON, G.E. **Química geral**. vol1. 2^oed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

BROWN, M.E.; CHANG, M.CY. Exploring bacterial lignin degradation. **Elsevier ScienceDirect**, California, 2013.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G.J.; **Invertebrados**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

BUGG, T.DH. et al. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. **Elsevier ScienceDirect**, Canada, 2010.

CAMACHO, C. et al. **Emulsifying activity and stability of a non-toxic bioemulsifier synthesized by *Microbacterium* sp. MC3B-10**. Int. J. Mol. Sci, 2013.

CFAOC. **Capitania Fluvial da Amazônia Ocidental**. 2013. Disponível em <<http://www.mar.mil.br/cfaoc>. acessado em: 20 jan.2017.

COSTA. *et al.*; Obtenção de consórcio de microrganismos a partir de amostra de petróleo. **Revista Ciências & Tecnologia**, Pernambuco, n1, jul/dezembro, 2007.

CONSTANTINE, R. Isóptera. in: CONSTANTINE, R. et al. **Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia**. Ribeirão Preto: Holos, Editora Ltda-ME, 2012. p. 311-321.

COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicações de biossurfactante. **Vetor: revista de ciências exatas e engenharia**. Rio Grande, n. 13, pg. 85 -103, 2003.

COTTA, J.A.O. *et al.* Avaliação de solventes de extração por ultrassom usando-se cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados. **Quim. Nova**. São Carlos Vol. 32, n. 8, p.2026-2033, 2009.

Environmental Protection Agency U. S. EPA, **Method 8015B**, Nonhalogenated Organics using GC/FID. Disponível em [http:// www.ntis.gov](http://www.ntis.gov) and <http://epa.gov>. acessado em 22 Junho, 2017.

EVARISTO, A.M. et al. **Normas e padrões para trabalhos acadêmicos e científicos da Unoest**. 3 ed. Presidente Prudente: Unoeste – Universidade do Oeste Paulista, 2015.

HADIBARATA, T.; TACHIBANA, S. **Microbial degradation of crude oil by fungi pre-grown on wood meal**. Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry. V. 2. P. 317-322, 2009.

HARITASH, A.K.; KAUSHIK, C.P; Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. **Journal of Hazardous Materials**. India. fev./marc, 2009.

HILCKMAM, C.P.J. et al. **Princípios Integrados de Zoologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

INCKOT, R.C. et al. **ANATOMIA DAS PLÂNTULAS DE *MIMOSA PILULIFERA* (LEGUMINOSAE) CRESCENDO EM SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO E SOLO BIORREMEIADO**. Departamento de Botânica. Laboratório de Botânica Estrutural. Curitiba. 2008. Disponível em <<http://www.cleusabona@ufpr.br>>. acessado em: 20 jan.2016.

ILOPF. **The International Tanker Owners Pollution Federation Limited- Oil tanker spill statistics**: 2016. Disponível em: <http://www.itopf.com>. Acessado em: 05/04/2017.

JAIN, D.K.; COLLINS, T.D.L.; LEE, H.; TREVORS, J.T. A drop–collapsing test for screening surfactant–producing microorganisms. **Journal Microbiology Methods**, n13. p. 271-279.1991.

KENNISH, J. M. **Ecology of estuaries: anthropogenic effects**. Boca Raton, CRC Press, p. 494. 2004.

KHORASANI, A. C.; MASHREGHI, M.; YAGHAMAEI, S. Estudo sobre biodegradação de Mazut pela estirpe recentemente isolada *Enterobacter cloacae* BBRC10061: melhoria e pesquisa cinética. **Iranian journal of environmental health Science & engineering**. Irã, v. 10 (1), 2013.

LAWNICZAK, L.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, L. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. **Applied microbiology and biotechnology**. Vol. 97, Ed 6, p. 2327–2339, Março 20013.

LIMA, J.T.; LEONARDO. A.M.C. **Recursos alimentares explorados pelos cupins Insecta: Isoptera**. Biota Neotropica. 2007. Disponível em:<www.biotaneotropica.org.br/v7n2/pt/abstract?thematic-review+bn04007022007>. Acessado em: 02 de Janeiro de 2016.

MAHON, C.R.; MANUSELIS, G.Jr. **Textbook of diagnostic microbiology**. Saunders Co. Philadelphia, 1997.

MAKKAR, R.S.; ROCKNE, K.J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environ Toxicol Chem**. n. 22. p. 2280–2292. 2003.

MARIANO, A. M., et al. The use of vinasse as an amendment to ex-situ bioremediation of soil and groundwater contaminated with diesel oil. **Brasilian archives of biology and technology**. vol.52, n. 4, Julh/Aug. Curitiba, 2009.

Disponível em: <<http://www.doi.org/10.1590/S1516-89132009000400030>>. Acessado em: 12 de julho. 2017.

MARÍN, J.A. et al. **Bioremediation by composting of heavy oil refinery sludge in semiarid conditions. Biodegradation.** 2006.

MATTANOVICH, D. et.al. Open access to sequence: browsing ter Pichia pastoris genome. **Microbial Cell Factories**, Washington, v. 53, p.8, 2009.

Mezzatesta, M.L.; Gona, F.; Stefani, S. Complexo Enterobacter cloacae : impacto clínico e resistência aos antibióticos emergentes. **Futuro Microbiol.** 2012.

MORESCHI, J.C. **Biodegradação da madeira.** Universidade Federal do Paraná. Apostila do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Curitiba, 1998.

NCCLS. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco difusão:** Norma Aprovada. vol. 23, n. 1, 2005.

NEFF, J.M. **Polyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Sources, fates and biological effects. Applied Science.** London. p. 262. 1979.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, Campinas, vol. 25, n. 5, p.772-776, mar. 2002.

OKOH, A. I.; TREJO, H. M. R. Remediation of petroleum hydrocarbon polluted systems: exploiting the bioremediation strategies. **African Journal of.**

OLIVEIRA, C. P. F. **Biomarcadores moleculares, genotóxicos e enzimáticos de efeitos do petróleo em tambaqui (*Colossoma macropomum*): subsídios para o monitoramento ambiental na amazônia.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Amazonas, 2010. 158p.

PELCZAR, M. J.Jr.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia conceitos e aplicações.** 2. ed. São Paulo: Pearson Makron Books, 1997.

PELLIZARI, V. H. **Aspectos moleculares e fenotípicos de bactérias isoladas do ambiente e envolvidas na biodegradação de bifenilos policlorados – PCBs.** 1995. 67 p. Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PERUZZO, F.M.; CANTO, E.L. **Química na abordagem do cotidiano.**4.ed. São Paulo: Moderna, 2006.

PETROBRÁS. Disponível em< <http://www.petrobras.com.br>> Acessado em: 06 de Março de 2017.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F; EICHHORN,S.E. **Biologia Vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

ROCHA; J.C; ROSA; A.H; CARDOSO; A.A. **Introdução a química ambiental**. 2° ed. Porto Alegre. Bookman, 2009.

SCHWARZENBACH, R. P.; GSCHWEND, P. M.; IMBODEM, D.M. **Environmental Organic Chemistry**. Copyright, John Wiley & Sons. Nova York.1993.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do sul: EDUCS, 2002.

SILVA, M. G. et al. M.I. & BAISCH, P. 2005. **Estudo da contaminação por HPAs no sedimento em região próxima a uma refinaria de petróleo**. Congresso Brasileiro de Oceanografia, p. 235-238.

SIMS, R. C. et al. **Waste/soil treatability studies for four complex industrial wastes: methodologies and results**. USEPA, Robert S. Kerr Environmental Research Laboratory, v. 1, p. 154, 1988.

SISINNO, O. C. et al. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em resíduos sólidos industriais: uma avaliação preliminar do risco potencial de contaminação ambiental e humana em áreas de disposição de resíduos**. Cad. Saúde Pública. Rio de Janeiro, 2003.

SOBERÓN, C. G.; MAIER, R.M. Biosurfactants: a General Overview. **Biosurfactants Springer-Verlag**. Alemanha, p. 1–11, 2011.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE.C.B. **Química Orgânica**. 10.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

SOTERO, M.A., et al,. A conservative region of the mercuric reductase gene (*merA*) as a molecular marker of bacterial mercury resistance. **Brazilian Journal of microbiology**. nº 2. São Paulo, Abr/Jun 2008.

STALLWOOD, B. et al. Low temperature bioremediation of oil-contaminated soil using biostimulation and bioaugmentation with a *Pseudomonas* sp. from maritime Antarctica. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 794–802, 2005.

TEDESCO, M. J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre, 1995.

THONGARAM, T. et al. **Comparison of bacterial community es in the alkaline gut segment among various species of higher termites**. Extremophiles , Tokyo, v. 9, n. 3, p. 229-238, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneus, 2008.

UZOIGWE, C. et al. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Frontiers in Microbiology**. Reino Unido, v. 6, n.10.3389, p. 245, Abr. 2015.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. **SPME, solid phase micro-extraction**. Fundamental aspects of Solid Phase Micro-Extraction (SPME) are discussed in the present paper. The application of SPME as a microtechnique of sample preparation for gas chromatographic analysis is considered and related to existing theoretical models. Both research prototypes and commercial SPME devices are considered. **Química nova: Microextração por fase sólida**. Instituto de Química Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2009.

VENDRAMEL, S. et al.; Treatment of petroleum refinery wastewater in a submerged fixed-bed aerobic bioreactor. **2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering**. Rio de Janeiro. Disponível em <<http://www.capes.org.br>>. acessado em: 10 jan.2016.

VERSCHUEREN, K. **Handbook of environmental data of organicchemicals**. 4 ed. Chichester, England: Wiley traduzir, 2001.

VIANA, F.V. **Acumulação de HPAS pela *Spartina alterniflora* cultivada em solo de landfarming de indústria petroquímica**. Dissertação (Mestrado em oceanografia física, química e geológica). Universidade Federal do Rio Grande-RG. 2008.

VOLLHARDT, K. P.; SCHORE, E. N. **Química orgânica: estrutura e função**. 4.ed. Porto Alegre: Bookmam, 2004.

YANG, H. et al. Niche heterogeneity determines bacterial community structure in the termite gut (*Reticulitermes santonenensis*). **Environmental Microbiology**, Oxon, v.7, n.7, p. 916-932. 2005.

ANEXOS

Anexo A: Sequência obtida e o resultado da identificação molecular

> A2H

CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCG
 TGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTT
 GTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACT
 CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACT
 GGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGG
 CTCAACCTGGGAACTGCATTGAACTGGCAGGCTGGAGTCTTGTAGAGGGGG
 GTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGT
 GGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGG
 GAGCAAACAGGATTAGATAC

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Enterobacter sp. strain ATY 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	821	821	100%	0.0	100%	KX458151.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter cloacae subsp. cloacae strain GPUS2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	821	821	100%	0.0	100%	MF398399.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter sp. strain GPUL7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	821	821	100%	0.0	100%	MF398374.1
<input type="checkbox"/> Salmonella enterica subsp. salamae serovar 55:k:z39 str. 1315K complete genome	821	5719	100%	0.0	100%	CP022139.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter sp. strain PA26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	821	821	100%	0.0	100%	KX528118.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter sp. strain R8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	821	821	100%	0.0	100%	KY996716.1
<input type="checkbox"/> Uncultured Enterobacter sp. clone TOPO18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	821	821	100%	0.0	100%	KY927479.1
<input type="checkbox"/> Uncultured Enterobacter sp. clone TOPO17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	821	821	100%	0.0	100%	KY927478.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter cloacae strain RS-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	821	821	100%	0.0	100%	KY952691.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter cloacae strain PGL09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	821	821	100%	0.0	100%	KY492312.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter cloacae subsp. cloacae strain SPS-E5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	821	821	100%	0.0	100%	KY810500.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter cloacae strain UKMB2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	821	821	100%	0.0	100%	KX957795.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter cloacae strain UKMS13R2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	821	821	100%	0.0	100%	KX957793.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter sp. strain PQ02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	821	821	100%	0.0	100%	KY570322.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter cloacae strain KSR38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	821	821	100%	0.0	100%	KY458547.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter cloacae strain KSR37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	821	821	100%	0.0	100%	KY458546.1
<input type="checkbox"/> Enterobacter cloacae strain KNB30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	821	821	100%	0.0	100%	KY458526.1

Anexo B- Valores obtidos em espectrofotômetro, para construção do gráfico que representa o perfil de crescimento de *E. cloacae*

<i>Enterobacter cloacae</i>						
Dias	Abs frasco 1	Abs frasco 2	Abs frasco 3	Abs frasco 4	Media	Desvio padrão
0	0,01	0,01	0,01	0,01	0	0
1	0,05	0,14	0,30	0,02	0,127	0,125174545
2	0,15	0,21	0,32	0,22	0,22575	0,07196469
3	0,41	0,41	0,75	0,40	0,4935	0,172419063
4	1,03	0,79	2,51	0,89	1,306	0,808790455
5	4,10	2,64	2,34	2,42	2,875	0,826458307
6	6,47	3,00	4,51	7,61	5,3975	2,047850499
7	9,37	7,69	8,48	9,91	8,8625	0,979093969
8	12,90	13,70	7,86	15,28	12,435	3,206301088
9	17,34	16,84	15,42	18,72	17,08	1,362644488
10	20,75	26,25	10,95	28,15	21,525	7,716810654
11	13,30	26,55	14,40	30,65	21,225	8,690464123
12	16,40	31,00	10,65	34,70	23,1875	11,50118653
13	18,35	32,40	9,65	26,90	21,825	9,964813094
14	17,60	33,50	13,80	30,10	23,75	9,525579597
15	14,35	34,15	10,30	40,45	24,8125	14,73993301
16	15,90	38,60	9,25	30,20	23,4875	13,33818922
17	12,90	35,75	9,65	37,65	23,9875	14,75936849
18	19,20	24,15	11,65	26,20	20,3	6,472119694
19	17,65	25,20	11,90	31,85	21,65	8,712156258
20	19,70	35,95	12,70	32,20	25,1375	10,81737607
21	24,10	28,25	12,95	33,70	24,75	8,794221588
22	10,30	27,00	11,50	24,10	18,225	8,554677083
23	17,55	24,95	14,20	17,00	18,425	4,590660809
24	18,00	35,40	11,50	28,20	23,275	10,61049009
25	13,80	29,50	15,20	19,80	19,575	7,095714669
26	17,90	30,00	11,40	14,40	18,425	8,161035474
27	16,30	27,90	13,60	16,70	18,625	6,334758612
28	19,60	31,50	16,50	17,10	21,175	7,013023599
29	13,90	19,70	11,60	22,80	17	5,154286242
30	18,00	24,00	14,80	18,00	18,7	3,841874542
31	15,90	21,00	12,80	15,60	16,325	3,415040263
32	16,00	22,20	11,30	17,00	16,625	4,470924587
33	16,80	26,30	15,00	21,00	19,775	5,024191477
34	18,80	28,50	13,40	20,40	20,275	6,247866302
35	16,40	31,60	13,80	22,10	20,975	7,886010821
36	21,90	33,10	14,00	24,80	23,45	7,887754222

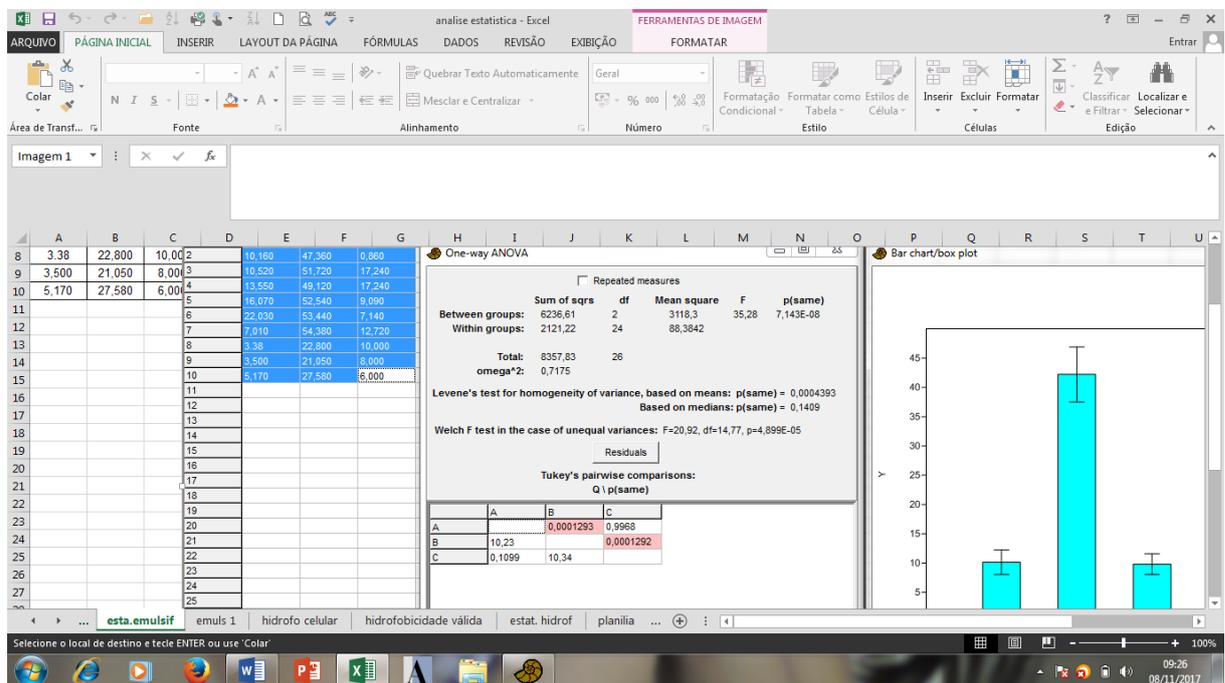
37	19,70	21,80	16,60	34,30	23,1	7,766165935
38	14,60	21,40	15,90	17,10	17,25	2,949011134
39	16,50	18,50	14,20	18,60	16,95	2,072840241
40	20,50	22,00	11,50	24,90	19,725	5,779489597
41	19,40	25,50	14,70	19,00	19,65	4,442596838
42	19,50	26,00	15,00	23,60	21,025	4,830717683
43	16,10	20,90	15,30	21,60	18,475	3,233548103
44	16,80	18,10	14,00	12,20	15,275	2,670049937
45	16,00	17,20	17,00	15,00	16,3	1,01324561
46	21,00	35,30	19,00	17,90	23,3	8,102263058
47	18,30	17,00	18,20	15,90	17,35	1,132843031
48	20,30	20,90	18,10	16,80	19,025	1,910279212
49	19,40	21,40	13,90	13,40	17,025	3,986957905
50	16,50	22,50	19,60	16,10	18,675	2,991515781
51	11,40	19,60	18,00	15,10	16,025	3,602198403
52	15,60	18,00	11,90	18,10	15,9	2,906314963
53	15,40	13,40	15,40	14,00	14,55	1,011599394
54	14,50	17,30	15,70	9,60	14,275	3,32101892
55	17,30	22,60	19,40	15,30	18,65	3,120363227
56	15,00	28,80	15,10	11,30	17,55	7,705625651
57	15,00	27,90	16,30	13,10	18,075	6,680506468
58	19,40	24,20	22,10	22,10	21,95	1,967231557
59	23,80	24,10	23,60	17,10	22,15	3,372931465
60	20,90	23,30	20,10	18,50	20,7	2
61	21,00	24,00	17,40	13,10	18,875	4,701329599
62	15,00	15,80	12,80	8,50	13,025	3,272486313
63	16,90	15,20	17,00	9,90	14,75	3,337164465
64	17,10	26,30	10,40	8,20	15,5	8,134289561
65	21,50	30,20	21,70	12,20	21,36666667	9,004628439
66	21,50	29,00	22,00	14,50	21,75	5,923118548
67	11,30	24,20	14,40	10,50	15,1	6,295501039
68	23,50	15,30	16,40	11,10	16,575	5,150647209
69	17,90	29,20	21,00	10,40	19,625	7,781334504
70	15,40	23,20	17,30	15,20	17,775	3,738426585
71	17,40	31,20	18,90	18,00	21,375	6,578943684
72	15,20	22,40	17,80	16,70	18,025	3,105237511
73	18,50	24,00	17,50	16,70	19,175	3,299873735
74	16,90	31,00	16,80	12,30	19,25	8,121781414
75	22,00	26,30	20,40	14,00	20,675	5,0999183
76	19,80	19,50	31,00	15,70	21,5	6,60252477
77	15,90	23,20	14,00	15,10	17,05	4,173328009
78	24,00	20,40	20,20	18,30	20,725	2,379600807
79	18,80	23,50	17,10	12,50	17,975	4,544135415
80	20,20	22,70	17,40	13,70	18,5	3,863504454

81	18,75	24,25	19,35	19,80	20,5375	2,512095739
82	20,50	22,95	18,65	14,60	19,175	3,52195495
83	23,00	27,50	22,80	15,90	22,3	4,786787371
84	23,00	26,00	19,00	12,90	20,225	5,662964477
85	26,35	28,35	20,75	11,70	21,7875	7,454682533
86	21,30	29,00	21,10	16,00	21,85	5,360659163
87	21,50	27,10	21,70	20,70	22,75	2,932007276
88	22,35	26,65	22,10	14,30	21,35	5,14311838
89	24,30	27,00	22,70	16,60	22,65	4,406434689
90	17,60	26,50	18,60	14,30	19,25	5,170751074
91	20,70	25,40	16,00	13,70	18,95	5,193906686
92	18,20	25,60	18,00	13,20	18,75	5,118267936
93	18,00	21,60	20,00	14,00	18,4	3,282275633
94	21,00	24,00	23,00	20,00	22	1,825741858
95	24,00	33,00	22,00	20,00	24,75	5,737304826
96	26,00	25,50	21,80	16,90	22,55	4,206740623
97	19,70	22,90	18,70	15,00	19,075	3,254099978
98	23,80	25,00	28,00	18,00	23,7	4,190465368
99	19,60	19,30	17,50	16,70	18,275	1,400892573
100	21,00	30,00	26,00	15,40	23,1	6,317172363
101	17,70	22,90	7,70	10,80	14,775	6,841722493
102	20,50	24,90	10,30	18,90	18,65	6,117461347
103	21,00	25,00	18,00	13,80	19,45	4,733920151
104	19,60	15,70	10,00	9,30	13,65	4,893873721
105	15,80	17,00	14,20	7,20	13,55	4,385962456
106	17,00	20,00	15,00	13,00	16,25	2,986078811
107	12,90	13,90	10,90	11,20	12,225	1,422146265
108	9,70	15,00	12,00	7,50	11,05	3,210918872
109	13,00	17,00	10,50	4,70	11,3	5,150404515
110	13.1	16,00	11,00	5,00	10,66666667	5,507570547

ANEXO C- Resultados do teste da atividade emulsificante de sobrenadante de cultura de *E. cloacae*

Valores (cm) 24h											
6 dias	Tubo	Hexano			Xileno			Petróleo			
		Alt	Emu	%E	Alt	Emu	%E	Alt	Meu	%E	
Frasco 1	1	5,90	0,60	10,16	5,70	2,70	47,36	5,80	0,50	0,86	
	2	5,70	0,60	10,52	5,80	3,00	51,72	5,80	1,00	17,24	
	3	5,90	0,80	13,55	5,70	2,80	49,12	5,80	1,00	17,24	
Frasco 2	1	5,60	0,90	16,07	5,90	3,10	52,54	5,50	0,50	9,09	
	2	5,90	1,30	22,03	5,80	3,10	53,44	5,60	0,40	7,14	
	3	5,70	0,40	7,01	5,70	3,10	54,38	5,50	0,70	12,72	
Frasco 3	1	5,90	0,20	3,38	5,70	1,30	22,80	5,00	0,50	10,00	
	2	5,70	0,20	3,50	5,70	1,20	21,05	5,00	0,40	8,00	
	3	5,80	0,30	5,17	5,80	1,60	27,58	5,00	0,30	6,00	

Alt= altura total. Emu= altura da emulsão. %E= porcentagem da emulsão



ANEXO D- Resultados do teste de hidrofobicidade celular de *E. cloacae*

6 dias	Tubo	Hexano		Xileno		Petróleo	
		Abs	Aderência Celular	Abs	Aderência Celular	Abs	Aderência Celular
Frasco 1	1	0,198	60,400	0,197	60,600	0,178	64,400
	2	0,191	61,800	0,220	56,000	0,159	68,200
	3	0,210	58,000	0,166	66,800	0,306	38,800
Frasco 2	1	0,360	28,000	0,321	35,800	0,315	37,000
	2	0,339	32,200	0,314	37,200	0,322	35,600
	3	0,352	29,600	0,377	24,600	0,330	34,000
Frasco 3	1	0,337	32,600	0,303	39,400	0,252	49,600
	2	0,358	28,400	0,380	24,000	0,253	49,400
	3	0,349	30,200	0,417	16,600	0,302	39,600

Abs= absorvância

