

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
RAMNOLÍPIDIOS ISOLADAS DE POÇOS DE PETRÓLEO**

MARIA DO SOCORRO DUARTE

RECIFE-2003

MARIA DO SOCORRO DUARTE

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
RAMNOLÍPIDIOS ISOLADAS DE POÇOS DE PETRÓLEO**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE
PRODUTOS BIOATIVOS PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

Área de concentração: Microbiologia Aplicada

MARIA DO SOCORRO DUARTE

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
RAMNOLÍPIDIOS ISOLADAS DE POÇOS DE PETRÓLEO**

Dissertação aprovada em / / 2003, pela Banca Examinadora:

Profa. Dra. Janete Magali de Araújo
Orientadora

Dra. Ester Ribeiro Gouveia
Co-orientadora

Recife-2003

Dedico

Aos meus pais, José Lacerda e Maria José
(*In memoriam*) que com seus exemplos de
vida me ensinaram valores como
honestidade, persistência e respeito supremo
pela vida. Saudades...

Ofereço

As minhas filhas, Paula e Raiane que
enriquecem e iluminam minha vida a cada dia.

AGRADECIMENTOS

A DEUS pela presença em todos os momentos.

A Profa. Dra. Janete Magali de Araújo pela orientação, dedicação e amizade ao longo deste trabalho.

A Dra. Ester Ribeiro Gouveia pela orientação na realização deste trabalho.

As Irmãs Therezinha Lima e Socorro Nogueira pelo estímulo, força e compreensão.

A Vilma que acreditou em meu potencial e me impulsionou a ir adiante sempre.

As minhas irmãs Graça e Cecília, minhas sobrinhas Renata e Priscila pelo apoio e incentivo.

As amigas Zilmar e Fátima pela força, estímulo e amizade.

Aos colegas Francisco Júnior, Elvira, Eliana e Juliana pela ajuda e paciência.

A Profa. Glícia Calazans pelo apoio e amizade.

Uma menção especial à amiga Gláucia Lima pela valiosa e constante contribuição.

A amiga Profa. Dra. Rejane Pimentel pelo apoio.

A amiga Dinabel pela colaboração.

As amigas Alba Marques e Rejane Martins pelo incentivo.

Aos colegas Antonio Travassos e Sandra pela disponibilidade.

A todos os professores do Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos (UFPE), em especial a Profa. Fátima, por todo apoio.

Aos amigos do Mestrado, especialmente Daniela, pelos momentos de descontração.

Aos amigos do laboratório Orlando, Fátima, Luciane, Paulo, Rita, Alberto, Sérgio, Tatiane e, em especial, Daniele, pela grande contribuição.

A ex-bibliotecária Glória Alencastro e a estagiária Silvia pela disponibilidade em atender aos pedidos dos artigos.

A secretária do curso Sueli pela valiosa ajuda.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do ramnolipídeo (RL1) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Desai e Banat, 1997).....	6
Figura 2. Kit Bac-Tray III para identificação de bactérias oxidase positiva.....	15
Figura 3. Esquema do processo fermentação.....	18
Figura 4. Diâmetro do halo em mm das bactérias produtoras de ramnolipídeo	21
Figura 5. Halo azul em meio sólido com brometo de cetiltrimetilamônio mais azul de metileno.....	22
Figura 6. Reação bioquímica da linhagem 610- (A5)	23
Figura 7. Variação da tensão superficial.....	24
Figura 8. Produção de ramnolipídeo por 6 bactérias em meio (MMR) a 30°C em função do tempo.....	25
Figura 9. Variação do crescimento das 6 bactérias em função do tempo em meio (MMR) a 30°C.....	26
Figura 10. Consumo de glicerol em função do tempo.....	26
Figura 11. Variação do pH em função do tempo.....	27
Figura 12. Quantificação do DNA extraído de 5 bactérias testadas para produção de biosurfactantes. 1º poço: DNA de fago $\lambda = 5$ ng; 2º poço: DNA $\lambda = 125$ ng; nos poços de 3 a 7: <i>P. aeruginosa</i> 573, <i>P. aeruginosa</i> 569, <i>P. sp.</i> 615, <i>P. aeruginosa</i> 572, <i>P. aeruginosa</i> 610; 8º poço: DNA $\lambda = 250$ ng.....	27
Figura 13. Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA obtidos das 5 bactérias testadas para produção de biosurfactantes com o primer OPQ-04. M(marcador 1Kb), nos poços de 1 a 5: <i>P. aeruginosa</i> 573, <i>P. aeruginosa</i> 569, <i>P. sp.</i> 615, <i>P. aeruginosa</i> 572, <i>P. aeruginosa</i> 610.....	28
Figura 14. Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA obtidos das 5 bactérias testadas para produção de biosurfactantes com os primers OPR-01 e OPX - 19. M(marcador 1Kb), nos poços de 1 a 5: <i>P. aeruginosa</i> 573, <i>P. aeruginosa</i> 569, <i>P. sp.</i> 615, <i>P. aeruginosa</i> 572, <i>P. aeruginosa</i> 610.....	28

Figura 15. Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA obtido das 5 bactérias testadas para produção de biosurfactantes com o primer OPA-09. M (marcador 1Kb); nos poços de 1 a 5: <i>P. aeruginosa</i> 573, <i>P. aeruginosa</i> 569, <i>P. sp.</i> 615, <i>P. aeruginosa</i> 572, <i>P. aeruginosa</i> 610.....	29
---	----

Figura 16: Dendrograma construído a partir dos perfis de RAPD.....	30
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variedade de biosurfactantes produzidos pelos microrganismos.....	4
Tabela 2. Relação das bactérias utilizadas.....	13
Tabela 3. Componentes do MIX de amplificação de DNA utilizado na reação.	20
Tabela 4. Quantificação de ramnolipídeo e medida da tensão superficial em três dias de fermentação utilizando-se glicerol como fonte de carbono.....	25
Tabela 5. Primers utilizados na reação de RAPD.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

AP	- Amostra de Poço
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	- Dinucleotídeo Trifosfato
EDTA	- Etilenodiamino
g/L	- Grama por Litro
µg	- Micrograma
µL	- Microlitro
µm	- Micrômetro
mg	- Miligrama
mL	- Mililitro
mN.m ⁻¹	- Milinewton por metro
MMR	- Meio Mineral para Ramnolipídeo
MPK	- Meio para <i>Pseudomonas</i>
PCR	- Reação em Cadeia de Polimerase
pH	- Potencial Hidrogeniônico
RAPD	- DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso
SDS	-Dodecil Sulfato de Sódio
TSA	- Tryptic Soy Ágar
v/v	- Volume por Volume

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Biosurfactantes.....	3
2.1.1 Glicolipídeos.....	5
2.2 Aplicações dos biosurfactantes.....	7
2.3 Condições que influenciam a produção de biosurfactantes.....	9
2.4 RAPD – DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Microrganismos.....	13
3.2 Meios de cultura.....	14
3.2.1 Manutenção das linhagens.....	14
3.2.2 Meio para seleção primária.....	14
3.3 Material para o teste de identificação das bactérias.....	14
3.3.1 Meio para produção de ramnolipídeos.....	15
3.4 Avaliação analítica	15
3.4.1 Concentração de biomassa.....	15
3.4.2 Concentração de glicerol.....	15
3.4.3 Quantificação de ramnolipídeo.....	16
3.4.4 Tensão superficial.....	16
3.5 Procedimento experimental.....	16
3.5.1 Seleção primária.....	16
3.5.2 Identificação bioquímica.....	17

3.5.3 Fermentação.....	17
3.5.4 Caracterização molecular.....	18
3.5.4.1 Extração do DNA total.....	18
3.5.4.2 Quantificação do DNA.....	19
3.5.4.3 Amplificação do DNA pela técnica de RAPD.....	19
3.6 Análise dos dados.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1 Caracterização de bactérias produtoras de ramnolipídeos.....	21
4.2 Identificação das bactérias selecionadas.....	22
4.3 Investigação sobre a produção de ramnolipídeo.....	23
4.4 Caracterização molecular.....	27
5. CONCLUSÕES	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
7. APÊNDICE.....	41

RESUMO

A aplicação de biosurfactantes em indústrias de diversos ramos vem crescendo a cada ano, porém, no momento, é na indústria do petróleo onde reside o seu maior potencial de aplicação. Devido a sua aceitação ecológica comparada aos surfactantes químicos, os biosurfactantes se apresentam como uma excelente alternativa aos químicos para determinadas áreas industriais. Diante deste fato, o objetivo do presente trabalho, é verificar se as 15 linhagens bacterianas isoladas de poços de petróleo produzem o biosurfactante ramnolipídeo e entre as produtoras realizar identificação taxonômica e molecular. Os resultados obtidos mostram que das 15 linhagens, 6 se destacaram pela formação de maiores halos azuis (10 mm a 17mm) em presença de cetiltrimetilamônio (CTAB). Estudos para identificação taxonômica através de testes bioquímicos mostram que as 5 bactérias Gram-negativas são oxidase positiva e a bactéria Gram-positiva é oxidase negativa. As bactérias oxidase positivas foram analisadas no sistema Bac Tray III (Difco), sendo 4 identificadas como pertencentes à espécie *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto 1, possivelmente *P. cepacia*, necessitando de outros testes bioquímicos para confirmação. A bactéria Gram-positiva esporulada e oxidase negativa pertencem ao gênero *Bacillus* sp.. A produção de ramnolipídeo tendo como fonte de carbono glicerol mostrou que *P. cepacia* 615-E2 e *P. aeruginosa* 572-BB2 exibiram a maior produção e menor tensão superficial respectivamente, 0,71 e 0,66 g L⁻¹ de ramnose e 29,0 mN m⁻¹ e 30,0 mN m⁻¹, após 72 horas de cultivo. Foram utilizados na técnica de RAPD quatro primers, que geraram um total de 38 bandas, das quais 74% foram polimórficas. Através da análise do dendrograma verificou-se que as linhagens de *Pseudomonas* apresentaram 50% de similaridade entre si.

ABSTRACT

The application of biosurfactants in industries of many types has improved year by year, however, it is in oil industry where we find greatest potential of application. Its ecological acceptance compared to chemical surfactants, the biosurfactants show an excellent alternative in their substitution. The objective of this work was to investigate the production of the biosurfactants rhamnolipids through six isolated bacteria strains from petroleum deposits, and to verify the existence of similarities among these bacteria. The results showed that from 15 strains, 6 showed the greatest blue aureole (10 mm to 17 mm) in contact with cetyltrimetilamonium (CTAB). Taxonomic studies using biochemical tests showed that five bacteria Gram-positive were positive oxidize and the Gram-positive bacteria was negative oxidize. The positive oxidize bacteria were analyzed in the Bac Tray III (Difco) system, and 4 identified as the *Pseudomonas aeruginosa* while 1, was *P. cepacia*, but it needs another bioquimic tests to confirm. The sporulate Gram-positive bacterium and negative oxidize belongs to *Bacillus sp.* genera. The rhamnolipids production with glycerol carbon source showed that *P. cepacia* 615-E2 and *P. aeruginosa* 572-BB2 showed the highest production of rhamnolipids and the lowest superficial tension, 0,71 and 0,66 g L⁻¹ of rhamnase and 29,0 mN m⁻¹ and 30,0 mN m⁻¹, 72 hours after cultivating respectively. Using four primers from the RAPD technique, which produced 38 bands, which 74% were polymorphic. The dendrogram analysis verified that the strains of *Pseudomonas* showed 50% of similarity among them.

1. INTRODUÇÃO

A grande quantidade de resíduos derivados do petróleo, emitidos por indústrias de diversos setores vem promovendo um grande impacto ambiental e a utilização de metabólitos como biosurfactantes é de grande interesse para as indústrias farmacêuticas, cosméticos, alimentos e petrolíferas.

Biosurfactantes são metabólitos produzidos por diferentes microrganismos, particularmente por bactérias, que apresentam moléculas anfipáticas, com porções hidrofílicas e hidrofóbicas (Desai *et al.*, 1997). Os microrganismos produzem biosurfactantes a partir de substratos como hidrocarbonetos, gorduras, óleos e graxas, formando emulsões as quais auxiliam na disponibilidade destes compostos à célula microbiana (Gerson, 1993).

O aparecimento de bioemulsificantes ou compostos de superfície ativa no meio de cultura ou unidos às paredes celulares, geralmente é considerado um pré-requisito para as interações iniciais entre os hidrocarbonetos e a célula microbiana. Estes compostos reduzem a tensão interfacial entre o óleo e a fase aquosa, diminuem o diâmetro médio das gotas de óleo e propiciam o aumento da área interfacial. A adaptação dos microrganismos ao substrato se deve à produção e uso da superfície ativa do biosurfactante que ajuda a absorver, emulsificar, umedecer e solubilizar o substrato insolúvel em água (Hommel, 1990).

Várias aplicações de biosurfactantes têm sido observadas, porém, é na indústria do petróleo o seu maior potencial, salientando sua utilização na degradação de hidrocarbonetos (Banat, 1995; Arino *et al.*, 1997), na biorremediação de solos contaminados por metais pesados (Mulligan *et al.*, 2001), biodegradação de pesticidas (Mata-Sandoval *et al.*, 2001) e em estudos moleculares (Rahim *et al.*, 2001).

A principal vantagem dos biosurfactantes em relação aos surfactantes químicos é a sua aceitação ecológica, devido a sua baixa toxicidade e biodegradabilidade no ambiente. Além disso, os biosurfactantes podem ser aplicados em condições extrema de temperatura e pH. Os surfactantes químicos causam problemas ecológicos devido a sua resistência à degradação, toxicidade e

acumulação no ecossistema. (Garcil *et al.*, 1992; Fiechter, 1992; Pruthi e Cameotra, 1997; Santa Anna *et al.*, 2001)

Em decorrência da grande importância biotecnológica dos ramnolipídeos produzidos por bactérias, este trabalho teve como objetivo geral investigar a produção de ramnolipídeos por bactérias isoladas de poços de petróleo, verificando a similaridade entre as bactérias produtoras. E como objetivos específicos, caracterizar em meio sólido as bactérias produtoras de ramnolipídeos, realizar a identificação taxonômica por métodos bioquímicos e moleculares das bactérias caracterizadas como melhores produtoras e investigar a produção de ramnolipídeos pelas bactérias selecionadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOSURFACTANTES

Os biosurfactantes são metabólitos produzidos por microrganismos que apresentam um grupo hidrofílico e um grupo hidrofóbico, claramente definido dentro da mesma molécula, facilitando a formação de micro emulsões. A parte lipofílica é uma região formada por uma cadeia de hidrocarboneto de um ácido graxo, enquanto que a porção polar ou hidrofílica é derivada de grupos éster ou álcool de lipídios neutros. Em decorrência dessas propriedades, essas moléculas reduzem a tensão superficial, criando micro emulsões onde os hidrocarbonetos podem se solubilizar em água ou a água em hidrocarbonetos (Lang e Wagner, 1987; Reiser *et al.*, 1989; Georgiou *et al.*, 1992). Este comportamento decorre da formação de micelas que se acumulam na interface, intermediando as diferentes fases de polaridade, tais como, óleo/água, ar/água ou sólido/água atuando como um agente umectante. Este processo dinâmico é baseado na habilidade do surfactante reduzir a tensão superficial, dirigindo o arranjo de moléculas líquidas que influencia a formação de pontes de hidrogênio e a interação hidrofóbica - hidrofílica (Fiechter, 1992).

Segundo Witholt (1990), a tensão superficial mínima e a concentração de micelas são parâmetros usados para medir a eficiência de um biosurfactante.

Uma emulsão é definida como um sistema heterogêneo, consistindo de pelo menos um líquido imiscível dispersante em um outro na forma de bolhas, cujo diâmetro, em geral, não excede a 0,1mm. Enquanto que o termo bioemulsificador é usado para descrever a combinação de todos os compostos da superfície ativa que constitui a emulsão secretada pela célula para facilitar a absorção de um substrato insolúvel (Hommel, 1990).

Os biosurfactantes podem fazer parte da constituição da parede celular, como também ser intra ou extracelulares (Bertrand *et al.*, 1994). A maioria destes compostos é de natureza lipídica e apresentam propriedades semelhantes aos surfactantes sintéticos (Cooper e Zajic, 1980).

Uma grande variedade de microrganismos é reconhecida como produtora de biosurfactantes, e, segundo Georgiou *et al.* (1992), o tipo, a quantidade

e a qualidade do biosurfactante são influenciados pela natureza do substrato, concentração de íons - P, N, Mg, O₂ e Fe⁻ - no meio de cultura, além das condições de cultivo. Na Tabela 1 pode ser observada a ampla diversidade microbiana produtora de biosurfactantes. Dentre estes microrganismos, têm se destacado, os estudos realizados com *Pseudomonas aeruginosa* (Ochsner e Reiser, 1995; Benincasa *et al.*, 2001; Mulligan *et al.*, 2001; Rahim *et al.*, 2001).

Tabela 1 Variedade de biosurfactantes produzidos pelos microrganismos.

Microrganismo	Biosurfactante	Referência
<i>Bacillus licheniformis</i>	Lipopeptídeo	Horowitz <i>et al</i> (1990)
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactina	Arima <i>et al</i> (1968)
<i>Bacillus sp.</i>	Ramnolipídeo	Banat (1993)
<i>Candida bombicol</i>	Soforolipídeo	Gobbert <i>et al</i> (1984)
<i>Candida lipolytica</i> Y-917	Soforolipídeo	Lesik <i>et al</i> (1989)
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Fosfolipídeo	Akit <i>et al</i> (1981)
<i>Penicillium spinulosum</i>	Ácido espiculosporum	Ban e Sato (1973)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ramnolipídeo	Robert <i>et al</i> (1989)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipopeptídeo	Neu <i>et al</i> (1990)
<i>Rhodococcus sp.</i>	Glicolipídeo	Abu-Ruwaida <i>et al</i> (1991a)
<i>Rhodococcus sp.</i>	Polissacarídeo	Neu <i>et al</i> (1992)
<i>Ustilago zeae</i>	Cellobiolipídeo	Boothroyd <i>et al</i> (1956)

Os surfactantes sintéticos foram usados na indústria do petróleo para auxiliar na limpeza de tanques e nos derramamentos de petróleo - desastre ecológico - e também para aumentar a recuperação do petróleo nos reservatórios. Entretanto, estes compostos sintéticos não são biodegradáveis e podem causar um grande impacto no ambiente pela sua alta toxidez (Banat, 1995; Santa Anna *et al.*, 2000).

Uma das propriedades mais importante dos biosurfactantes é a diminuição da tensão superficial para valores menores que 30mN/m, como relatado por Lin (1996). Quanto a sua função fisiológica, ela não é muito clara, embora possa desencadear um papel importante na sobrevivência do microrganismo produtor, facilitando o transporte de nutriente, ou atuando como biocida. Sendo que estas funções biológicas “in vivo” estão relacionadas com a propriedade anfipática dos biosurfactantes, como relatado por Bernheimer e Avigad (1971) e Itoh *et al* (1971).

2.1.1 Glicolipídeos

Os surfactantes sintetizados quimicamente são classificados de acordo com a natureza do seu grupo polar - catiônico, aniônico e não aniônico - enquanto os biosurfactantes são classificados principalmente por sua composição química e sua origem microbiana (Desai e Banat, 1997).

A grande variedade de estruturas é uma característica dos biosurfactantes, onde podem ser observados: glicolipídeos, lipopeptídeos, complexos proteínas-polissacarídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros (Georgiou *et al.*, 1992). É, portanto admissível contar com diversas propriedades e funções fisiológicas para estas diferentes famílias de biosurfactantes.

Entre os biosurfactantes, a família dos glicolipídeos compreende um grupo dos mais conhecidos que apresentam longas cadeias de ácido alifático ou ácido hidroxialifático. Neste grupo, os mais conhecidos são os ramnolipídeos, trealolipídeos e soforolipídeos (Reis, 1998). Segundo Desai e Banat (1997) uma espécie microbiana, dependendo da fonte de carbono disponível no processo de fermentação, pode produzir diferentes tipos de glicolipídeos.

Os ramnolipídeos foram isolados pela primeira vez por Bergstrom *et al* (1946) de *Pseudomonas pyocyanea* após crescimento em glicose, entretanto não foi possível determinar as proporções molares da ramnose e do ácido β -hidroxidecanoico. Posteriormente, Jarvis e Johnson (1949) mostraram que uma ligação glicosídica de β -hidróxidecanoil - β -hidroxidecanoato com duas moléculas de ramnose foi observada em cultivo de *P.aeruginosa* com 3% de glicerol (Parra *et al.*, 1989).

A estrutura química do ramnolipídeo só foi elucidada por Edwards e Hayashi (1965), os quais demonstraram a ligação 1,2 β-hidroxidecanoil-β-hidroxidecanoato após oxidação e metilação deste composto com periodato. Desai e Banat (1997) mostraram que este composto é constituído por 1 ou 2 moléculas de ramnose ligada a 1 ou 2 moléculas de ácido β-hidroxidecanóico e que os principais ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* são constituídos por L-ramnosil-β-hidroxidecanoil-β-hidroxidecanoato (RL2) e L-ramnosil-L-ramnosil-β-hidroxidecanoil-β-hidroxidecanoato (RL1) (Figura 1).

Carboidratos em combinação com uma longa cadeia de ácidos alifáticos ou hidroxialifático são conhecidos como glicosilados que são encontrados em membranas de grande número de bactérias (Rosenberg, 1986). O constituinte mono, di, tri ou tetrassacarídeo incluem glicose, galactose, ácido glicurônico, ramnose e galactose sulfato.

Estes compostos favorecem o crescimento de microrganismos em meios de culturas contendo como fonte de carbono substâncias hidrofóbicas como hidrocarbonetos (Cooper e Zajic, 1998). Jain *et al* (1992) relataram que mutantes de *P.aeruginosa*, deficientes em produzir ramnolipídeo, quando a fonte de carbono é um alcano, restaura a produção de ramnolipídeo.

Lang e Wagner (1987) relataram que os ramnolipídeos de *Pseudomonas. spp* baixam a tensão interfacial em n-hexadecano para 1mN m^{-1} e a tensão superficial para 25 a 30 mN m^{-1} .

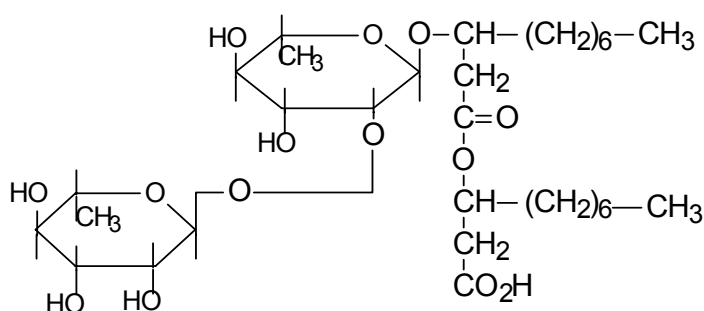


Figura 1 Estrutura química do ramnolipídeo (RL1) de *Pseudomonas aeruginosa* (Desai e Banat, 1997).

Trealolipídeos e soforolipídeos são glicolipídeos produzidos respectivamente por actinomicetos como *Rhodococcus* e por leveduras como *Torulopsis apicola* (Li *et al.*, 1984 e Goobert *et al.*, 1984). Trealolipídeo é constituído por ácido micólico ligado ao dissacarídeo trealose. O ácido micólico apresenta uma cadeia longa de ácido β -hidroxicarboxílico cujo tamanho, estrutura e grau de insaturação se apresenta diferente entre os microrganismos produtores destes biosurfactantes como *Rhodococcus*, *Nocardia* e *Corynebacterium* (Cooper *et al.*, 1979; Kretschmer *et al.*, 1982; Rapp *et al.*, 1979; Ristau e Wagner, 1983).

Desai e Banat (1997) salientaram que os trealolipídeos estão interligados a parede celular e podem ser facilmente extraídos através de tratamento com n-hexano.

A composição e o número de esterificação do ácido micólico nos trealolipídeos produzidos por diferentes gêneros de actinomicetos são influenciadas pelas condições de cultivo (Desai, 1987).

Soforolipídeo é um biosurfactante constituído por um dissacarídeo soforose, acetilado no carbono 6 e 6' a uma cadeia de ácido graxo hidroxilado. Durante a fermentação com *Torulopsis* são excretadas, uma mistura de 6 a 9 tipos de soforolipídeos altamente hidrofóbicos (Ito e Inoue, 1982).

2.2 APLICAÇÕES DOS BIOSURFACTANTES

Os biosurfactantes são de grande interesse industrial em decorrência do amplo espectro de aplicações, incluindo emulsificação, separação de fase, solubilização, estabilização, inibição de corrosão e redução da viscosidade (Kosaric *et al.*, 1987).

A aplicação comercial dos biosurfactantes é determinada pelo seu custo e propriedades em relação ao seu competidor, o surfactante sintético. Lin (1996) relata que o uso de biosurfactante nas indústrias químicas e de alimento não é competitivo em decorrência do seu alto custo de produção. Entretanto, sua vantagem em relação ao meio ambiente, pela sua ausência de toxicidade, apesar do custo econômico, faz com que estes compostos sejam bastante utilizados em desastres ecológicos (Thomas *et al.*, 1993; Scheibenbogen *et al.*, 1994).

Atualmente inúmeros acidentes de derramamento de petróleo em área costeira têm causado catástrofes ecológicas e sociais. A propriedade emulsificadora dos biosurfactantes tem demonstrado acelerar a degradação dos hidrocarbonetos no ambiente e assim se apresenta como um poderoso instrumento no controle da poluição ambiental (Atlas e Bartha 1992; Atlas, 1993; Bertrand *et al.*, 1994).

Substâncias com estes tipos de propriedades podem também ser utilizadas na agricultura, na construção civil, na produção de plásticos, na estabilização de alimentos e bebidas, em cosméticos e indústrias de couro, em papel e metal. Surfactantes são também usados em tintas e revestimentos de proteção, para processamento de produtos petroquímicos, em indústria têxtil e para despoluição (Kosaric, 1987).

O maior interesse industrial dos biosurfactantes reside nas aplicações para aumentar a recuperação do óleo por microrganismos e vários outros usos na indústria do petróleo (Chakrabarty, 1985). Outras áreas onde os biosurfactantes têm sido utilizados com sucesso residem no controle de vazamentos de óleo e na descontaminação microbiana do solo (Oberbremer *et al.*, 1989; Poremba *et al.*, 1991).

A aplicação de ramnolipídeos está relacionada a duas áreas: despoluição de oceanos e praias em virtude de derramamento de óleo que constitui um problema em escala mundial e remediação do solo, uma vez que os poluentes ambientais são de diversas origens como: resíduos industriais (tricloroetileno, pentaclorofenil, dioxina), produtos de refinaria (querosene, gasolina, óleo diesel, benzeno, tolueno), pesticidas e metais pesados como o cádmio.

De acordo com Reis (1998), um dos fatores que contribui para o interesse na produção de biosurfactante está no fato destes compostos apresentarem maiores variações estruturais, o que lhes confere maior potencial para aplicações específicas. Porém, a substituição de um surfactante sintético por um biosurfactante vai depender de uma produção mais econômica.

2.3 CONDIÇÕES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

As fontes de C e N, bem como condições ambientais - pH, temperatura, agitação e oxigênio disponível constituem importantes fatores na produção de biosurfactantes.

A escolha da fonte de carbono tem um importante papel sobre o rendimento dos biosurfactantes. Existem microrganismos que produzem biosurfactantes apenas quando crescem em hidrocarbonetos e outros que requerem substratos simples, solúveis em água tais como carboidratos e aminoácidos.

Algumas bactérias tais como *P. aeruginosa* produzem biosurfactante quando crescem em substratos solúveis e insolúveis em água, embora a produção no último seja maior. O comprimento da cadeia de hidrocarboneto tem um efeito significativo sobre a concentração final do produto no caldo fermentado (Georgiou *et al.*, 1992).

Rosenberg *et al* (1981) relatam que a produção de trealolipídeo por *Arthrobacter sp.* em presença de acetato ou etanol ocorre aderido a parede celular, enquanto em presença de hidrocarboneto o biosurfactante é excretado.

Desai *et al* (1988) realizando fermentações com *P. fluorescens* em diferentes fontes de carbono, observaram que a produção máxima de biosurfactantes só foi atingida quando se utilizou gasolina como fonte de carbono.

A produção de ramnolipídeo por *P. aeruginosa* 44T1, utilizando diferentes fontes de carbono só atingiu a máxima produção, quando óleo de oliva foi usado como substrato. Com esta fonte de carbono a produção máxima do ramnolipídeo foi $7,65 \text{ g L}^{-1}$ e a tensão superficial atingiu $28,4 \text{ dina cm}^{-1}$ (Robert *et al.*, 1989).

Banat *et al* (1991) observaram que uma bactéria Gram-negativa não identificada só produzia biosurfactantes, após consumo total da glicose e adição de hexadecano.

Benincasa *et al* (2001), trabalhando com linhagens de *P. aeruginosa* LBI crescendo sob detergente como fonte de carbono, verificaram que a alta taxa de produção de ramnolipídeo alcançada foi de 70%.

Além da fonte de carbono, outros constituintes do meio de cultura afetam a produção de biosurfactante. Compostos nitrogenados como: uréia, nitrato e

sais de amônio, bem como aminoácidos, ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina e glicina, podem ser utilizados como fonte de nitrogênio (Desai e Banat, 1997).

Abu-Ruwaida *et al* (1991), verificaram que o nitrato foi a melhor fonte de nitrogênio para a produção de biosurfactante por *P.aeruginosa* 44T1.

Mulligan e Bernard (1989) e Ramana *et al* (1989), trabalhando com *Pseudomonas* sp., demonstraram um aumento na produção de biosurfactante na fase estacionária de crescimento ocorreu em condições limitantes de nitrogênio e ferro.

Guerra-Santos *et al* (1984) verificaram que não houve produção de biosurfactante por *P. aeruginosa* quando a razão carbono/nitrogênio foi inferior a 11:1, isto é, quando o nitrogênio não foi um fator limitante no processo.

Condições ambientais como pH, temperatura e agitação também afetam a produção de biosurfactantes. A produção de ramnolipídeo por *Pseudomonas* spp. atinge seu valor máximo, quando o pH está entre 6,0 e 6,5. A temperatura causou alteração na composição do biosurfactante produzido por *Pseudomonas* spp. DSM-2874. Um aumento na velocidade de agitação pode reduzir o rendimento em decorrência do cisalhamento das células de *Nocardia erythropolis*. Por outro lado, em cultivos com leveduras, a produção de biosurfactante aumenta quando a agitação e a aeração aumentam (Desai e Banat, 1997).

2.4 RAPD – DNA POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AO ACASO

O conhecimento da genética molecular de bactérias avançou muito nos últimos 20 anos após o desenvolvimento da Tecnologia do DNA Recombinante. Com este avanço ocorreram várias mudanças nos tipos de acessos utilizados para caracterização e identificação de bactérias, fungos e na pesquisa de doenças (Ferreira e Grattapaglia, 1996; Louws *et al.*, 1999).

Embora existam diversas técnicas disponíveis, que permitem a obtenção de um número ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo, a técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction) tem se destacado. Tais marcadores genéticos são utilizados para a detecção da

variabilidade genética em nível de DNA, ou seja, para a detecção do polimorfismo, gerando informações sobre a diversidade genética.

Segundo Farah (1997), a técnica de PCR foi descrita no final dos anos 80 por Kary Mullis e tem revolucionado a genética molecular, pois explora a capacidade de duplicação do DNA, permitindo amplificar pequenos e específicos segmentos do genoma. Através desta técnica é possível obter *in vitro* várias cópias do segmento de DNA. É uma técnica muito versátil porque vários tipos de primers podem ser escolhidos, dependendo do objetivo do estudo. Contudo, esta metodologia ainda apresenta-se limitada, uma vez que há necessidade do conhecimento de certas regiões através da clonagem e seqüenciamento.

Fundamentados no princípio da PCR surgiram marcadores genéticos como: RAPD – DNA polimórfico Amplificado ao acaso, técnica descrita por Williams *et al* (1990) e por Welsh e McClelland (1990) onde estes últimos autores denominaram de AP – PCR (Arbitrarily Primed – PCR). Na técnica RAPD são utilizados oligonucleotídeos de seqüência arbitrária durante a reação. A amplificação ocorrerá quando o primer reconhecer um sítio de homologia em umas das fitas e também no mesmo sítio, porém com orientação invertida, na outra fita da molécula do DNA, dentro do intervalo limite da PCR (aproximadamente 4000pb).

Cada banda de DNA amplificado é o resultado da interação entre o oligonucleotídeo e o DNA molde, sendo o polimorfismo reconhecido pela presença de um fragmento amplificado em um dos genótipos em relação à ausência deste mesmo fragmento em outro genótipo. Este polimorfismo decorre de vários fatores como relatam Williams *et al* (1990).

Segundo Williams *et al* (1990) e Welsh e McClelland (1990) alterações na seqüência de bases nas regiões complementares dos oligonucleotídeos eliminam um sítio de ligação do oligonucleotídeo, e inserções de seqüência entre os sítios de ligações dos oligonucleotídeos, ultrapassam o limite da PCR, de forma que a amplificação não ocorre. Ambas as mutações são reconhecidas pela ausência da banda no gel. Entretanto, as inserções entre os sítios de ligação dos oligonucleotídeos que não ultrapassam o limite da PCR, farão com que a amplificação ocorra, mas produza uma banda de peso molecular maior, enquanto que as deleções entre os sítios de ligação dos oligonucleotídeos farão com que a amplificação ocorra produzindo uma banda de peso molecular menor.

De acordo com Williams *et al* (1993) o tamanho ideal do oligonucleotídeo para amplificação em RAPD deve ser de 10 pares de bases, e o seu conteúdo em GC em torno de 50 a 70%, além de não conter seqüências palindrômicas evitando o auto pareamento.

Uma vez que os primers são escolhidos ao acaso, alguns deles poderão dar origem a vários produtos de amplificação, enquanto outros poderão não ser capazes de gerar produtos de amplificação. Por isso, se faz necessário realizar uma seleção de primers que sejam apropriados para o estudo (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

Algumas vantagens da técnica RAPD, segundo Micheltore *et al* (1991), é a sua rapidez e a não utilização de hibridação ou radioatividade, além de requerer pequena quantidade de DNA que não precisa ser de alta qualidade como enfatizado por Manulis *et al* (1993) fazendo esta técnica amplamente utilizada na diferenciação de genótipos.

Esta técnica permite que rapidamente o grau de similaridade entre genótipos seja identificado em nível de inter e intraespécie.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MICRORGANISMOS

Foram utilizadas 15 bactérias pertencentes à Coleção de Culturas de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE e isoladas de poços de petróleo de Canto do Amaro-RN.

As linhagens utilizadas na seleção primária para a produção de ramnolipídeos estão relacionadas na Tabela 2.

Tabela 2 Relação das bactérias utilizadas.

Nº de acesso da Coleção	Linhagens	Fonte de isolamento (1)
521	1A	AP 029
573	DA1	AP 044
569	D1A1	AP 044
615	E2	AP 194
572	BB2	AP 044
610	A5	AP 194
611	B4	AP 194
613	C ₂	AP 194
575	D ₁ B ₂	AP 044
570	BA ₂	AP 044
612	C ₁	AP 194
509	G ₄	AP 029
614	D ₂	AP 194
571	D1A2	AP 044
568	DB1	AP 044

(1) Poços de petróleo

3.2 MEIOS DE CULTURA

3.2.1 Manutenção das Linhagens

Para a manutenção foi utilizado meio sólido MPK (King, *et al.*, 1954) com a seguinte composição (g/L): ágar - 12; triptona - 10; peptona - 10; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,5; K_2HPO_4 e pH 7,0 a 7,2.

3.2.2 Meio para Seleção Primária

Foi utilizado o meio MMR (Siegmund e Wagner, 1991) com a seguinte composição (g/L): KH_2PO_4 - 0,7; Na_2HPO_4 - 0,9; NaNO_3 - 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; solução de elementos traços 0,2mL ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 2g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 1,5g; $(\text{NH}_4)_6\text{MnO}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,6g; água destilada - 1000mL); cetiltrimetilamônio brometo (CTAB) - 0,2; azul de metileno - 0,005; ágar - 15g; e pH 7,0 a 7,2.

3.3 Material para o Teste de Identificação das Bactérias

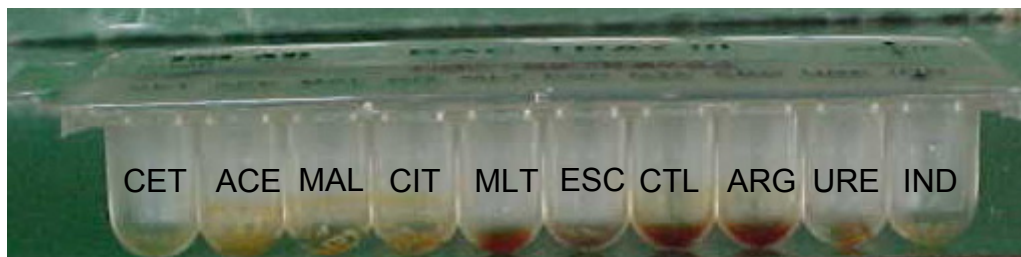
a) Teste de oxidase: tiras de papel de filtro (Whatman) contendo trimetil-p-fenildiamina (Difco).

b) Kit Bac-tray (Difco) Para identificação de bactérias Gram-negativas oxidase positiva (figura 2).

c) Meio confirmativo para *P.aeruginosa*.

Caldo asparagina: asparagina - 4g; KH_2PO_4 - 2g; K_2HPO_4 - 20 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1g; glicerol -16 mL; água destilada - 1000 mL e pH 6,9 a 7,2.

Caldo acetamida: acetamida 10g; NaCl 5g; KH_2PO_4 1,39g; K_2HPO_4 - 0,73g; vermelho de fenol - 0,012g, água destilada - 1000 mL e pH 6,9 a 7,2.



CET - Cetrimide

ACE - Acetamida

MAL - Malonato

CIT - Citrato

MLT - Maltose

ESC - Esculina

CTL - Controle de Descarboxilase

ARG - L-Arginina

URE - Uréia

IND - Indol

Figura 2 Kit Bac-Tray III para identificação de bactérias oxidase positiva

3.3.1 Meio para produção de ramnolipídeos

Para produção de ramnolipídeos foi utilizado meio líquido MG segundo Santa Anna *et al* (2000), com a seguinte composição em g/L: Glicerol 10; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0; KH_2PO_4 3,0; K_2HPO_4 7,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2; pH 6,5.

3.4 AVALIAÇÃO ANALÍTICA

3.4.1 Concentração de biomassa

A concentração de biomassa foi obtida por gravimetria após centrifugação das amostras a 12.000 rpm durante 5 minutos seguida de secagem a 80°C durante 24 horas.

3.4.2 Concentração de glicerol

A concentração de glicerol foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se uma coluna sugar Shodex (KS802), água ultrapura como fase móvel, 45°C e fluxo de 1mL/min.

3.4.3 Quantificação de ramnolipídeos

A quantificação de ramnolipídeo expressa em ramnose foi através do método fenol-ácido sulfúrico, onde as amostras da fermentação foram diluídas e adicionadas a cada tubo de ensaio 2 mL desta, seguido de 50 µL de fenol e 5 mL de ácido sulfúrico, seguido da leitura no espectrofotômetro a 480 nm (Dubois *et al.*, 1956).

3.4.4 Tensão superficial

Para medir a tensão superficial, foi utilizado o tensiômetro marca - CSC- 705-45, segundo metodologia Du Nouy desenvolvida originalmente por Dr. Pierre Lacmte (Cooper e Zajic, 1979). Neste método usa-se um anel de platina-iridium com 6 cm de circunferência o qual fica imerso no líquido a ser analisado. Durante a fermentação, alíquotas foram centrifugadas e do líquido livre de células, determinada a tensão superficial, à temperatura ambiente estando o aparelho devidamente calibrado.

3.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.5.1 Seleção Primária

Para caracterizar as linhagens produtoras de ramnolipídeos foi utilizada a metodologia de Siegmund e Wagner (1991), que usa meio sólido MMR adicionando cetiltrimetilamônio (CTAB) e azul de metileno. O meio sólido foi distribuído 20 mL por placas e após solidificação inoculado com 3µL de uma suspensão de células de cada bactéria a ser testada.

3.5.2 Identificação Bioquímica

Inicialmente foi realizado o teste de oxidase que consiste em colocar em cima da tira de papel de oxidase (Difco), já previamente embebida com água, uma colônia da bactéria teste. Neste teste, avalia-se a presença de citocromo oxidase ou indofenol oxidase, uma hemoproteína que catalisa o transporte de elétrons de compostos doadores de elétrons -NADH - para compostos aceptores, como oxigênio. O trimetil-p-fenildiamina funciona como um aceptor de elétrons.

O Kit Bac-Tray III foi inoculado com 1 mL de uma suspensão bacteriana, levemente turva (escala nº 1 McFarland) e incubado por 24h a 30°C. Após esse tempo foi realizada a leitura observando a modificação da coloração segundo manual de identificação da Difco.

A identificação bioquímica das linhagens DAUFPE - 521 (1A); DAUFPE -573 (DA1); DAUFPE - 569 (D1A1); DAUFPE - 572 (BB2); DAUFPE - 615 (E2); DAUFPE - 610 (A5) foram realizadas utilizando este sistema.

3.5.3 Fermentação

Cada bactéria foi cultivada por 24h em tubo inclinado nos meios MPK (Gram-negativa) e TSA (Gram-positiva).

As linhagens foram repicadas em tubos contendo meio sólido (item 3.2.1) e mantidas à temperatura de 30°C por 24 horas. Para preparação do inóculo de cada cultura, foi inoculada em frasco de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido (item 3.3.1) que foi cultivada a 30° C em mesa incubadora rotativa a 250 rpm durante 24h. De cada inóculo foram retirados 2 mL e distribuídos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 48 mL do meio líquido para fermentação e mantidos nas mesmas condições, durante 96 horas (Figura 3).

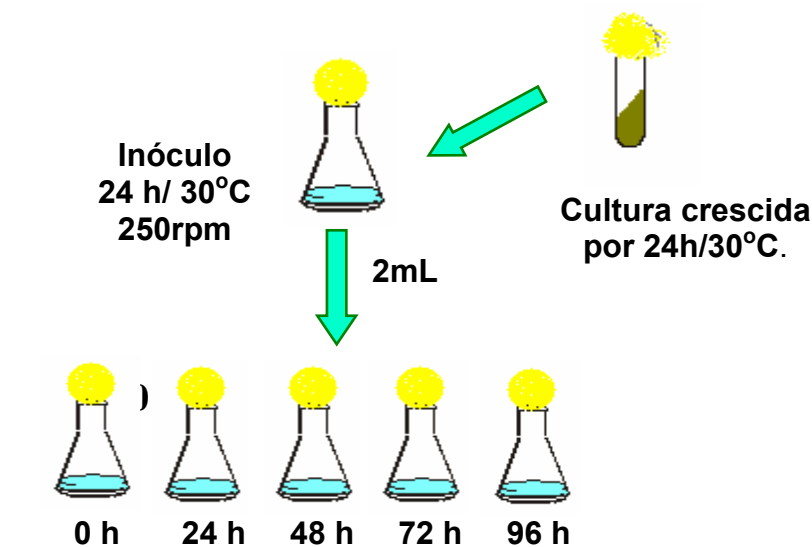


Figura 3 Esquema do processo de fermentação.

3.5.4 Caracterização Molecular

3.5.4.1 Extração do DNA total

Para a extração do DNA das bactérias, foi utilizada a técnica descrita por Sambrook *et al* (1989). As linhagens foram cultivadas em meio líquido (item 3.2.1) sob agitação de 250 rpm a 30°C durante 24 horas. Após este cultivo, 3mL foram centrifugados por 5 minutos a 12.000 rpm, o sedimento, massa celular, foi lavado com 1,5 mL de tampão TAS (apêndice) e novamente submetido à centrifugação em microtubo e ressuspendido em 0,5 mL do mesmo tampão. A amostra foi tratada com proteinase K (150µg/mL) e SDS (2%) homogeneizados e incubados a 50°C por 60 minutos. Após este tratamento foi realizado extração utilizando 400 µL de fenol, homogeneizado e centrifugado durante 2 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo, ao qual foi adicionado 500µL de clorofórmio e centrifugado por mais 2 minutos. O DNA foi precipitado com 30mM de acetato de potássio (pH 5,2) e 2 volume de etanol absoluto por 1 hora a temperatura de 4° C.

O microtubo foi então centrifugado a 12.000 rpm/15 minutos e o sobrenadante desprezado. O “pellet” contendo DNA foi lavado com 400 µL de etanol a 70% e novamente centrifugado por 2 minutos. Depois de seco, o sedimento foi ressuspenso em 60 µL de tampão TE (apêndice), pH 8,0 e preservado sob refrigeração.

3.5.4.2 Quantificação do DNA

A determinação da concentração do DNA foi realizada através da eletroforese em gel de agarose a 0,8% numa voltagem de 100V, utilizando como tampão de corrida Tris-Borato-EDTA TBE (0,5M) e o marcador de peso molecular - DNA do fago λ. Após a migração eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio e observado no transiluminador de luz ultravioleta, seguido do registro fotográfico em câmara Polaroid. A concentração do DNA foi estimada por comparação com amostras do DNA do fago λ em concentrações conhecidas.

3.5.4.3 Amplificação de DNA pela técnica de RAPD

Foram utilizados 8 primers arbitrários da Operon Technologies. As amplificações do DNA foram realizadas utilizando o mix de amplificação apresentado na Tabela 3 com volume final de 25 µL. As etapas de amplificação foram realizadas em termociclador (marca TECHNE), onde as amostras foram submetidas a ciclos de amplificação e desnaturação, como segue: temperatura de 94°C por um ciclo de 3 minutos, compreendendo a etapa de desnaturação, seguidos de 40 ciclos de 1 minuto a 90°C, outro ciclo de 1 minuto a 37°C, seguido de um ciclo de extensão final de 1 minuto a 72°C. Após a amplificação foram retirados 5 µL de cada amostra amplificada e adicionados a 3 µL do tampão da amostra (apêndice) e colocados nos poços do gel agarose a 1,2% e a corrida eletroforética realizada em tampão TBE (apêndice) (pH 8,0) numa voltagem de 100V. Foi utilizado o marcador de peso molecular

(LIFE TECHNOLOGY) de 1kb. Após a corrida, o material foi visualizado no transiluminador de luz ultravioleta e fotografado com câmara Polaroid.

Tabela 3 Componentes do MIX de amplificação de DNA utilizado na reação.

Componentes	Volume na reação RAPD
MgCl ₂ (3mM)	1,5 µL
Tampão (10x)	2,5 µL
dNTP (100 µL)	1,0 µL
Primer (5 µL)	3,0 µL
Água milli Q	14 µL
Taq polymerase (5 U/µL)	0,4 µL
DNA	3,0 µL
TOTAL	25 µL

3.6 ANÁLISE DOS DADOS

A partir da análise das bandas geradas no processo eletroforético indicando amplificação do DNA, os dados foram introduzidos nas formas de variáveis binárias, onde o número um (1) indica a presença de banda e o zero (0), ausência. Assim tornou-se possível construir uma matriz de similaridade através do programa computacional NTSYS (Applied Biobalistics, Inc.), com o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean), por meio do coeficiente de Jaccard (SJ) (Sneath e Socal, 1973).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE RAMNOLIPÍDEOS

A caracterização da produção de ramnolipídeo por 14 bactérias Gram-negativas e 1 Gram-positiva em meio sólido MMR com cetiltrimetilamônio foi observada através da formação do halo azul que variava de 2 a 20mm, como apresentado na Figura 4. Halos de 10 a 14,9mm só foram observados para 5 bactérias (BB2, A5, D1A1, DA1, 1A) após 120 horas de cultivo, enquanto a linhagem E2 (Gram-negativa) exibiu o maior halo em torno de 17mm com 120h de cultivo.

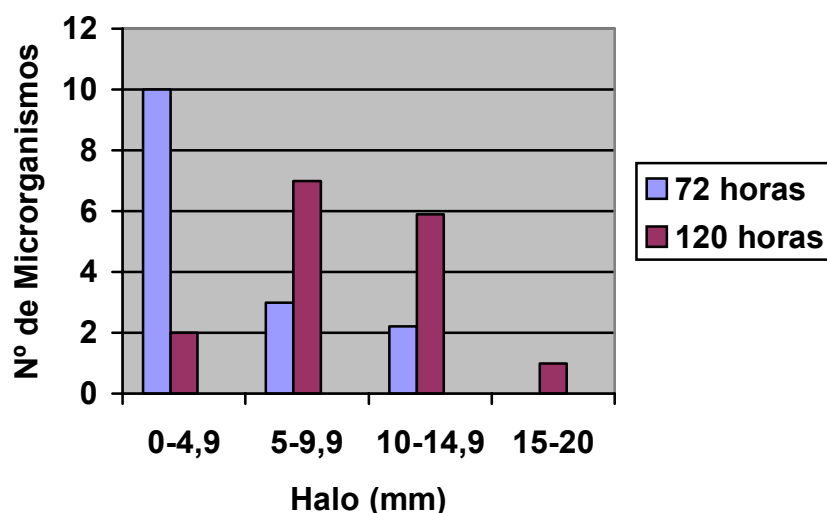


Figura 4 Diâmetro do halo (em mm) das bactérias produtoras de ramnolipídeos.

Segundo Siegmund e Wagner (1991), este ensaio para caracterização de linhagens produtoras de ramnolipídeo é um teste semiquantitativo onde o biosurfactante aniônico forma um par iônico insolúvel em presença de brometo cetiltrimetilamônio mais azul de metileno. Portanto, o halo azul escuro em volta da colônia (Figura 5) caracteriza a linhagem como produtora de biosurfactante aniônico. No ensaio primário para caracterização de bactérias produtoras de biosurfactante, geralmente se utiliza a atividade

hemolítica em meio ágar sangue, entretanto para bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas sp.* este ensaio seria mascarado, uma vez que nesta bactéria ocorre β -hemolisina responsável pelas zonas de clareamento no ágar sangue, através do processo hemolítico das células vermelhas do sangue (SIEGMUND e WAGNER 1991).

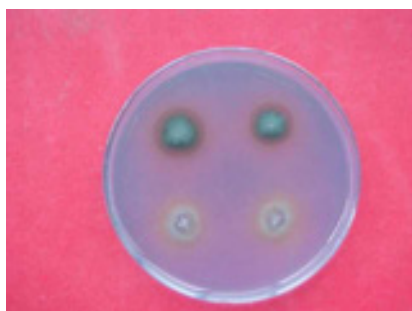


Figura 5 Halo azul em meio sólido com brometo de cetiltrimetilamônio mais azul de metileno.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS SELECIONADAS

Das 6 (seis) linhagens submetidas ao teste oxidase utilizando as - tiras de papel de filtro contendo tetrametil-p-fenildiamina- cinco linhagens [DAUFPE – 572(BB2); DAUFPE – 610(A5); DAUFPE - 569(D1A1); DAUFPE – 573(DA1); DAUFPE - 615(E2)] apresentaram-se positiva com formação de um composto azul escuro que é o indofenol azul indicando a presença de citocromo-oxidase. Todas estas linhagens Gram-negativas são oxidase positiva e formam pigmento esverdeado no meio de King (King *et al.*, 1954).

A única bactéria Gram-positiva esporulante foi a DAUFPE – 521(1A) que se mostrou oxidase negativa e tratando-se, portanto de um *Bacillus sp.*

A partir deste resultado - oxidase positiva - foi utilizado o kit enzimático BAC-TRAY III (Difco) para as reações bioquímicas de identificação a nível de espécie. Na Figura 6, observam-se as reações bioquímicas da linhagem DAUFPE - 610(A5) que de acordo com os resultados positivo ou negativo formou-se um código com três dígitos para acessar o Manual de identificação (Difco).

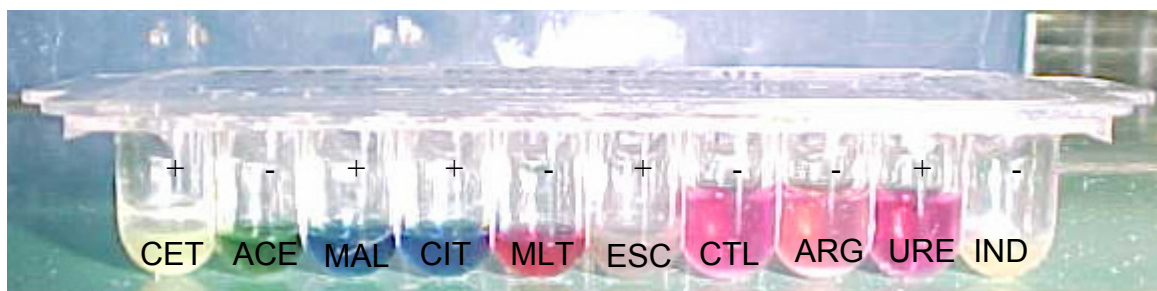


Figura 6 Reação bioquímica da linhagem DAUFPE – 610 -(A5)

Após a análise dos resultados bioquímicos de cada linhagem, foi possível determinar que as linhagens DAUFPE – 572 (BB2); DAUFPE – 610 (A5); DAUFPE – 569 (D1A1) e DAUFPE – 573 (DA1) pertencem à espécie *P.aeruginosa* sendo confirmada mais uma vez com os meios caldo asparagina e caldo acetamida. No primeiro com caldo asparagina por 24 horas de cultivo ocorre a liberação do pigmento fluorescente esverdeada, evidenciada através de luz UV enquanto no meio caldo acetamida este composto é fornecido como única fonte de carbono e de nitrogênio e o crescimento é determinado pela alcalinização do meio através da mudança de pH pelo indicador vermelho fenol. As quatro linhagens se apresentaram positiva nestes dois meios confirmando a espécie *P.aeruginosa*.

A linhagem DAUFPE 615-(E2) se apresentou negativa para estes dois meios e pelo código 52 do Manual de identificação (Difco) a espécie mais provável é *P.cepacia*, necessitando realizar outros testes bioquímicos para confirmação.

4.3 INVESTIGAÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEO

Em todas as linhagens a tensão superficial variou ao longo de todo o processo de fermentação. A tensão superficial de todas as linhagens avaliadas variou de aproximadamente 40 a 29 mN/m, com exceção das linhagens DA1 e D1A1, em que a tensão superficial baixou de 40 para 34 e 35 mN/m, respectivamente, como pode ser observada na Figura 7.

A diminuição da tensão superficial serviu como uma medida indireta para a determinação da produção de biosurfactantes, sendo esta hipótese confirmada com a quantificação de ramnose, como pode ser observado na Figura 8. Vale ressaltar que os menores valores de tensão superficial obtidos coincidiram com os maiores valores de concentração de ramnose, como pode ser observado na tabela 4.

Segundo Desai e Banat (1997), a tensão superficial durante a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* pode chegar a 29mN/m, de forma que os valores mínimos de tensão superficial encontrados no presente trabalho concordam com dados relatados na literatura.

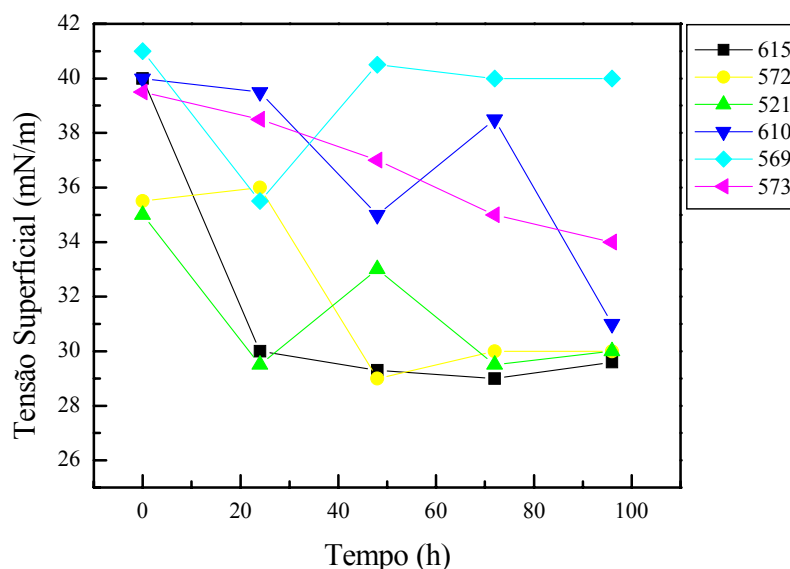


Figura 7 Variação da tensão superficial

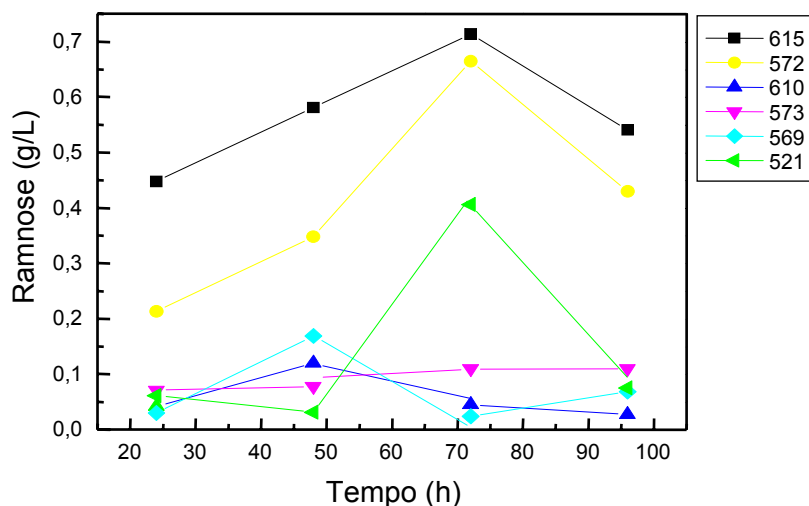


Figura 8 Produção de ramnolipídeo por 6 bactérias em meio (MMR) a 30°C em função do tempo

Santa Anna *et al* (2000) utilizando *P. aeruginosa* PA1, isolada de ambientes de petróleo, e mesmo meio de cultura, obtiveram 0,76g/L de ramnose após 7 dias de fermentação, sendo, portanto uma menor produtividade. No presente trabalho, o maior valor de ramnose obtido foi de 0,71 g/L com 3 dias de fermentação (*Pseudomona sp.* 615 -(E2)). O fato desta linhagem produzir uma maior quantidade de ramnolipídeo no espaço de tempo menor em relação a *P. aeruginosa* PA1, a torna um microrganismo de eleição, para estudos e investigação mais profunda, no que se refere a esta sua capacidade.

Tabela 4 Quantificação de ramnolipídeo e medida da tensão superficial em três dias de fermentação utilizando-se glicerol como fonte de carbono.

Linhagens	Ramnose mg/L	Tensão superficial inicial mN/m	Tensão Superficial (72h) mN/m	Redução da Tensão Superficial (%)
<i>P.sp.</i> – 615-E2	710,00	40,00	29,00	27,50
<i>P.aeruginosa</i> - 572-BB2	660,00	35,50	30,00	15,50
<i>P.aeruginosa</i> 610-A5	400,00	40,00	38,50	3,75
<i>P.aeruginosa</i> -569- D1A1	20,00	41,00	40,00	2,45
<i>P.aeruginosa</i> -573-DA1	40,00	39,50	35,00	11,40

A fase estacionária de crescimento foi alcançada aproximadamente com 48 horas de fermentação (Figura 9) e produção máxima de ramnolipídeos para 615, 572 e 521 ocorreu em 72 horas. As bactérias que apresentaram maior crescimento também apresentaram uma produção maior de ramnolipídeos em aproximadamente 48 horas de crescimento.

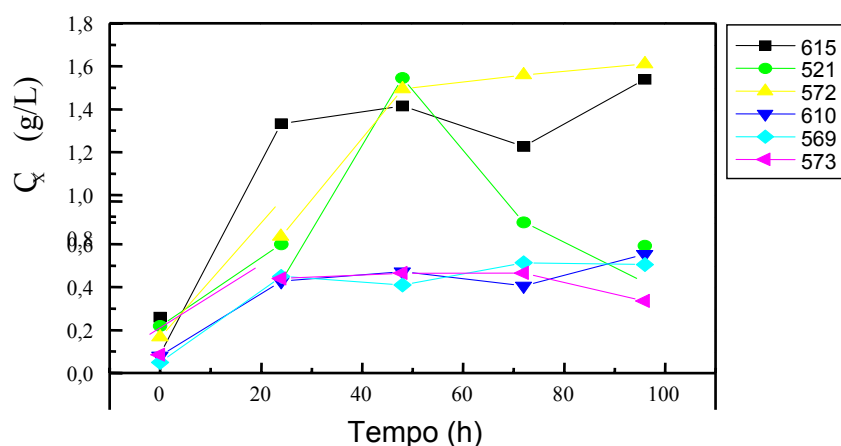


Figura 9 Variação do crescimento das 6 bactérias em função do tempo em meio (MMR) a 30°C

Com relação ao consumo de glicerol (Figura 10), em quase todos os casos, com exceção da fermentação com *P. aeruginosa* 572 - (BB2), a exaustão foi observada com aproximadamente 48 horas de cultivo. Na fermentação com 572 - (BB2) o consumo foi mais lento, dando-se a exaustão da fonte de carbono com cerca de 72 horas, daí a concentração máxima de biomassa ter sido alcançada apenas com 96 horas.

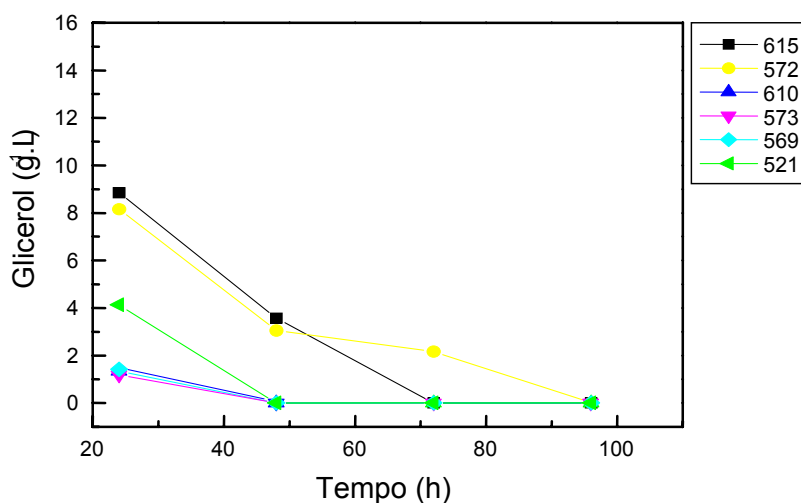


Figura 10 Consumo de glicerol em função do tempo

O pH, em todos os casos, apresentou uma pequena variação (Figura 11) diminuindo durante a fase de crescimento devido ao consumo de glicerol.

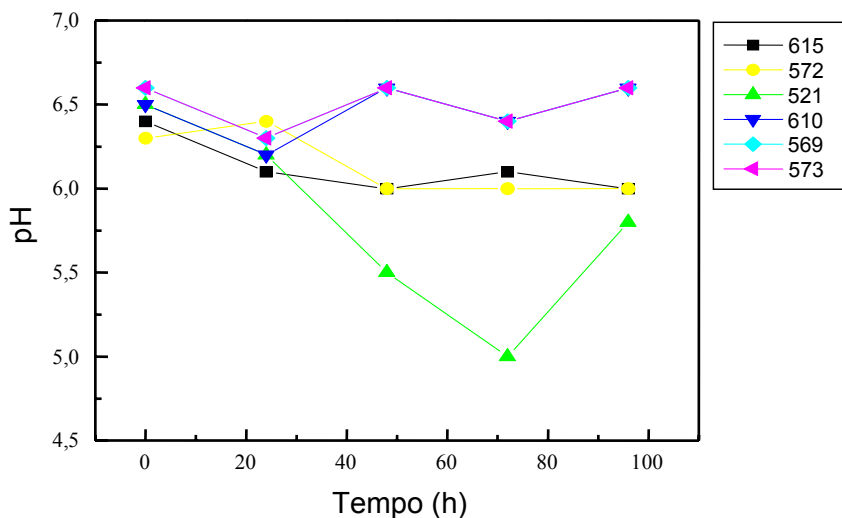


Figura 11 Variação do pH em função do tempo

4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

A quantificação do DNA das linhagens bacterianas pode ser observada na Figura 12. Estes resultados mostram bandas de alto peso molecular, não sendo observado arraste de degradação do DNA.

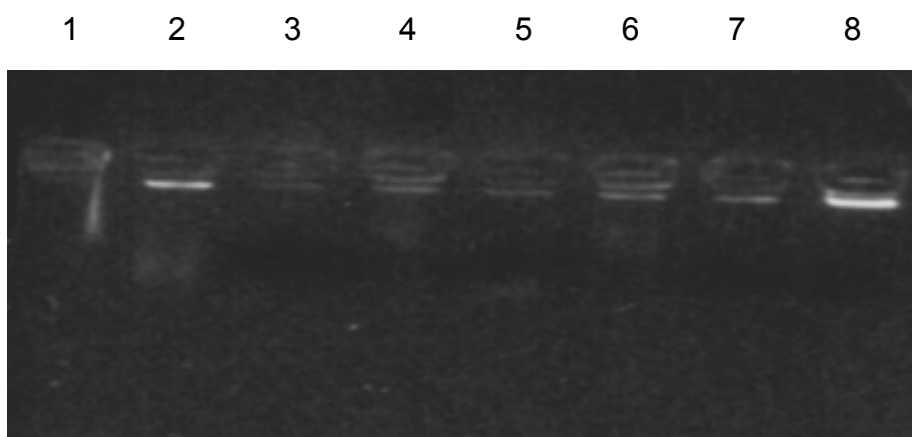


Figura 12 Quantificação do DNA extraído de 5 bactérias testadas para produção de biosurfactantes. 1º poço: DNA de fago λ = 5 ng; 2º poço: DNA λ = 125 ng; nos poços de 3 a 7: *P. aeruginosa* 573, *P. aeruginosa* 569, *P. sp.* 615, *P. aeruginosa* 572, *P. aeruginosa* 610; 8º poço: DNA λ = 250 ng.

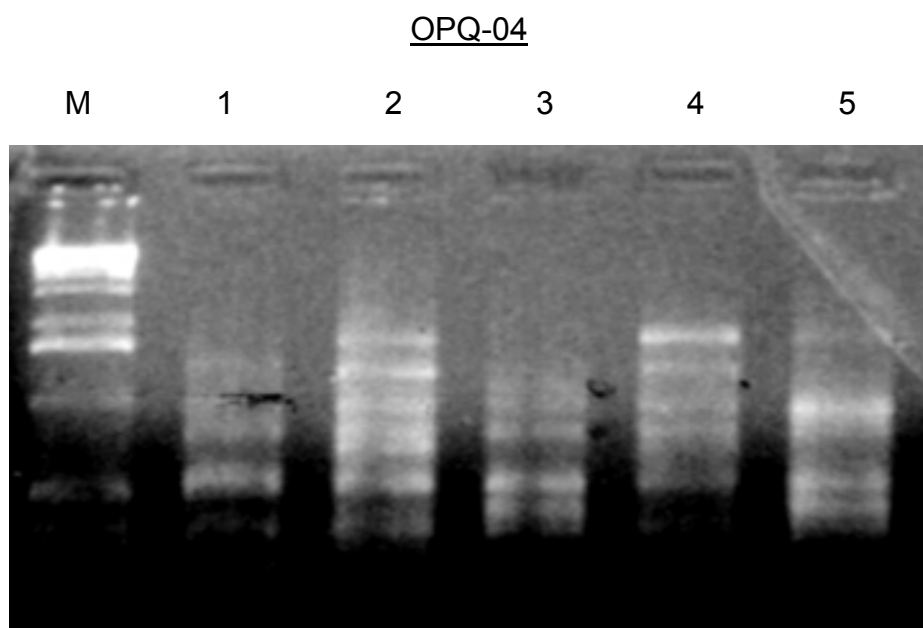


Figura 13 Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA obtidos das 5 bactérias testadas para produção de biosurfactantes com o primer OPQ-04. M(marcador 1Kb), nos poços de 1 a 5: *P. aeruginosa* 573, *P. aeruginosa* 569, *P. sp.* 615, *P. aeruginosa* 572, *P. aeruginosa* 610.

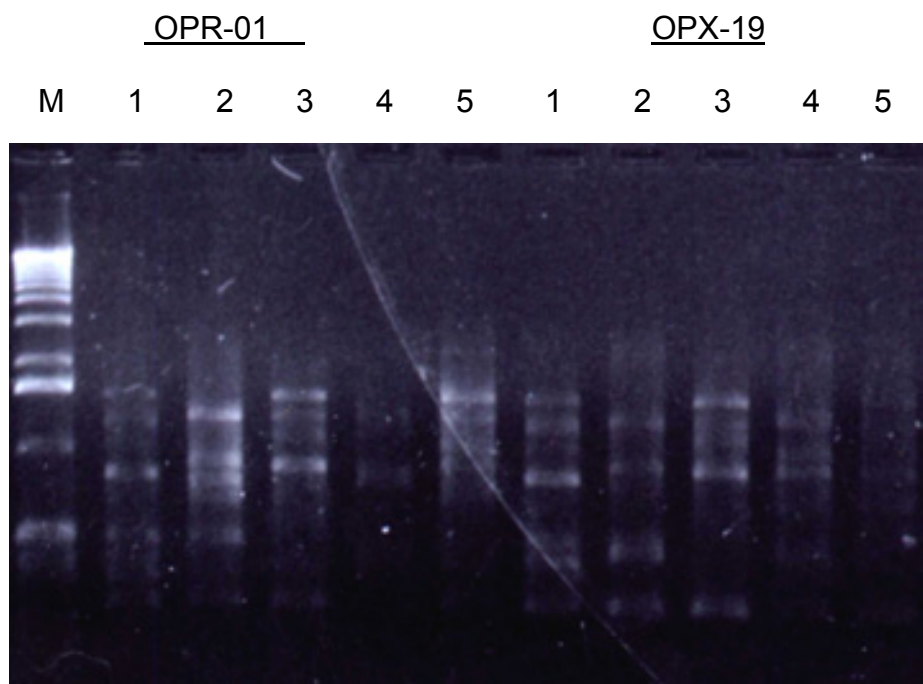


Figura 14 Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA obtidos das 5 bactérias testadas para produção de biosurfactantes com os primers OPR-01 e OPX - 19. M(marcador 1Kb), nos poços de 1 a 5: *P. aeruginosa* 573, *P. aeruginosa* 569, *P. sp.* 615, *P. aeruginosa* 572, *P. aeruginosa* 610.

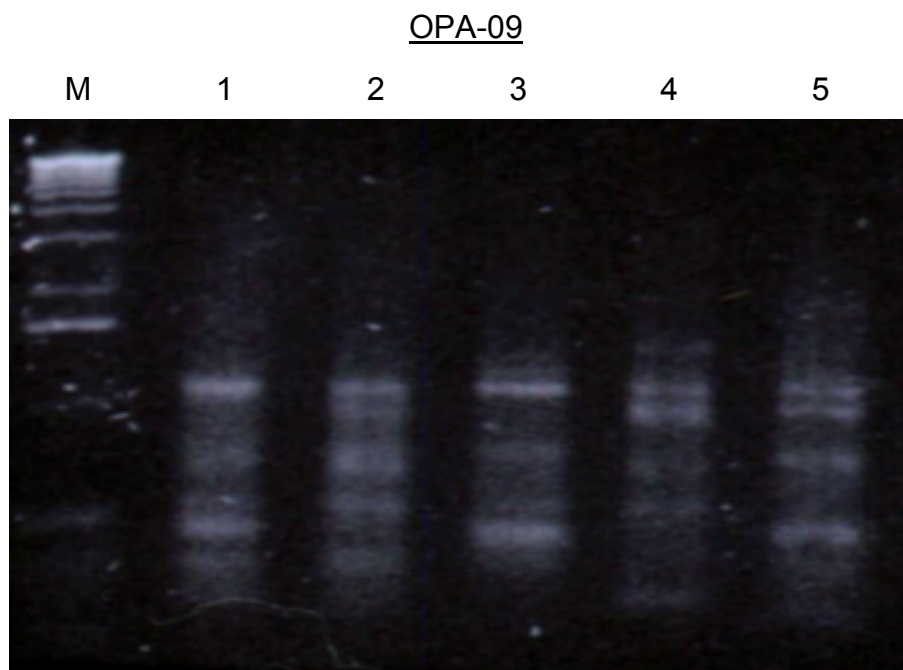


Figura 15 Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA obtido das 5 bactérias testadas para produção de biosurfactantes com o primer OPA-09. M (marcador 1Kb); nos poços de 1 a 5: *P. aeruginosa* 573, *P. aeruginosa* 569, *P. sp.* 615, *P. aeruginosa* 572, *P. aeruginosa* 610.

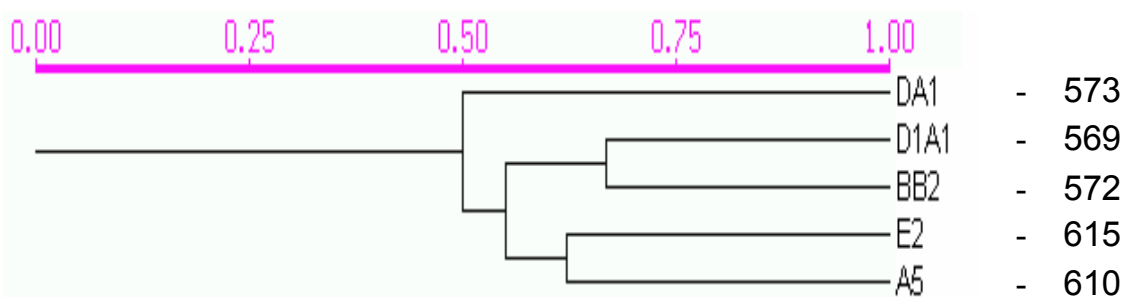
Para análise do RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) foram utilizados oito primers, dos quais, apenas quatro: OPQ-04, OPR-01, OPX-19 e OPA-09 foram capazes de gerar fragmentos bem definidos o que facilitou a visualização do polimorfismo entre as linhagens estudadas. A seqüência de nucleotídeos dos primers utilizados pode ser observada na Tabela 5.

Tabela 5 Primers utilizados na reação de RAPD.

Primer	Seqüência
OPQ-04	AGT GCG CTG A
OPR-01	TGC GGG TCC T
OPR-04	CCC GTA GCA C
OPR-06	GTC TAC GGC A
OPA-08	GTG ACG TAG G
OPA-09	GGG TAA CGC C
OPX-17	GAC ACG GAC C
OPX-19	TGG CAA GGC A

Os quatro primers escolhidos formaram um total de 38 bandas, das quais 28 eram polimórficas, cerca de 74%, enquanto que, 26% foram bandas monomórficas. Os fragmentos gerados pelos diferentes primers variaram de 0,2 a 2,5 kb. Os primers OPQ-04 e OPA-09 geraram nove bandas, o OPQ-04 três polimórficas e seis monomórficas, com bandas variando de 0,35 kb a 1,63 kb (figura 13), já o OPA-09 gerou seis bandas polimórficas e três monomórficas, com peso molecular de 0,2 kb a 1,6 kb (figura 15). O primer OPX-19 gerou onze bandas, três monomórficas e nove polimórficas, com peso molecular entre 0,3 kb e 1,6 kb (figura 14). O primer OPR-01 foi o escolhido para estudar a diversidade genética por ter gerado um número maior de bandas polimórficas, ou seja, 90,9% (figura 14). Dos onze fragmentos gerados, apenas um estava presente em todas as linhagens, com peso molecular de 1,4 kb. As bandas apresentaram variações entre 0,3 kb a 2,5 kb.

A partir da análise dessas bandas foi construído o dendrograma (Figura 16). Na análise do dendrograma verificou-se a formação de três grupos apresentando entre si 50% de similaridade: grupo 1 (*P. aeruginosa* 573), grupo 2 (*P. aeruginosa* 569 e 572) e grupo 3 (*P. sp.* 615 e *P. aeruginosa* 610). As linhagens do grupo 2 apresentaram um índice de similaridade de 70%, o maior entre os três grupos, isto sugere uma possível relação com a fonte de isolamento dessas linhagens. As linhagens do grupo 3 apresentaram uma similaridade de aproximadamente 62%, apesar de pertencerem a espécies diferentes. A linhagem do grupo 1 destacou-se dos outros grupos, ficando isolada com a similaridade de 50% com as demais.



r= 0,8273

Figura 16 Dendrograma construído a partir dos perfis de RAPD

CONCLUSÕES

- Todas as bactérias utilizadas produziram ramnolipídeos.
- Verificou-se produção de ramnolipídeo associada ao crescimento em todos os casos, sendo que, E2 (*Pseudomona* sp. 615) e BB2 (*P. aeruginosa* 572) apresentaram maior produção, respectivamente, 0,71 e 0,66 g/L em 72 horas, enquanto a tensão superficial baixou em 29 (E2) e 30 (BB2).
- A produção de ramnolipídeo em todos os casos coincidiu com o aumento da biomassa e esgotamento de glicerol.
- Verificou-se um nível de similaridade de 50% entre as espécies de *Pseudomonas* utilizadas. As linhagens *P. aeruginosa* 569 e *P. aeruginosa* 572 foram as que mais se destacaram, apresentando índice de similaridade em torno de 70% entre si.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

_____. Biosurfactants Production and Possible Uses in Microbial Enhanced Oil Recovery and Oil Pollution Remediation: A Review. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 1-12, 1995.

ABU-RUWAIDA, A.S.; BANAT, I. M. HADTIRTO, S.; SALEM, A.; KADRI, M. Isolation of biosurfactant-producing bacteria – product characterization and evaluation. **Acta Biotechnologica**, v. 11, p. 315-324, 1991.

AKIT, J. COOPER, D.J.; MANNINEN, K.I.; ZAJIC, J.E. Investigation of potential biosurfactant production among phytopathogenic *Corynebacteria* and related soil microbes. **Curr. Microbiol.**, v. 6, p. 145-150, 1981.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 31, p. 488-494, 1968.

ARINO, S.; MARCHAL, R. and VANDECASTEELE. Involvement of a rhamnolipid-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial community. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 769-776, 1998.

ATLAS, R. M. Bacteria and bioremediation of marine oil-spills. **Oceanus**, v. 36, p. 71 - 81, 1993.

ATLAS, R. M., AND A. K, BEG. Polymerase Chain Reaction . In Methods for General and Molecular Bacteriology. Eds. Philipp Gerhardt R.G.E. Murray; Willis A. Wood and Noel R. Krieg. **American Society for Microbiology**. p. 418 – 434, 1994.

ATLAS, R. M., AND BARTHA. Hydrocarbon biodegradation and oil - spill bioremediation. **Adv. Microbiol. Ecol.** v. 12, p. 287 - 338, 1992.

BAN, T. and SATO, T. Aqueous microbial biosurfactant solutions exhibiting ultra-low tension at oil-water interfaces. **Dev. Petr. Sei**, v. 39, p. 115 - 125, 1993.

BANAT, I. M. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. **Biotech. Lett.**, v. 15, p. 591-594, 1993.

BANAT, I. M., N. SAMARAH.; M. MURAD.; R. HORNEAND., S. BENERJEE. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up world. **J. Microbiol Biotechnology**. v. 7, p. 80 - 84, 1991.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M.A.; MORAES, I.O. Rhaminolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283-288, 2001.

BERGSTRÖM, S.; THEORELL, H.; DAVILE, H. On a metabolic product of *Pseudomona pyocyanea* pyolipic acid, active against *M. tuberculosis*. **Ark Kem Mineral Geol.** p. 1 – 12, 1946.

BERNHEIMER, A.W., and AVIGARD, L. S. Nature and properties of cytological agent produced by *Bacillus subtilis*. **Journal of General Microbiology**. v. 61, p. 361 - 369, 1970.

BERTRAND, J.C.; BONIN, P.; GOUTIX, M.; GAUTHIER, M.; MILLE. G. The application of biosurfactants in combatting hidrocarbon pollution in marine environments. **Research in Microbiology**, v. 145, 1994.

BOOTHROYD, B.; THORN, A.; HASKINS, R.H. Biochemistry of the ustilaginales. XII. Characterization of ectracellular glycolipids produced by *Ustilago* sp. **Can. J. biochem. Physiol.**, v. 34, p. 10-14, 1956.

BURGER, M. M.; GLASER, L.; BURTON, M. R. The enzymatic synthesis of rhamnose – containing glycolipids by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Biolog. Chem.** v. 238, p. 2595 – 2602, 1963.

CHAKRABART, A. M. **Trends biotechnol.** v. 3, p. 32, 1985.

CHAYABUTRA, C.; WU, J. e JU, L. K. Rhamnolipid production by *pseudomonas aeruginosa* under denitrification: effects of limiting nutrients and carbon substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, p. 25-33, 2001.

COOPER, D. G., S. N. LISS.; R. LONGAY and J. E. ZAJIC. Surface activities of *Mycobacterium* and *Pseudomonas*. **J. Ferment. Technol.** v. 59, p. 97 - 101, 1989.

COOPER, D.G.; ZAJIC, J.E. Surface active compounds from microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v. 26, p. 229-252, 1980.

DESAI, A. J.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 61, p. 47 – 64, 1997.

DESAI, A. J.; K. M. PATEL and J. D. DESAI. Emulsifier production by *Pseudomonas fluorescens* during the growth on hydrocarbons. **Curr. Sci.** v. 57, p. 500 - 501, 1988.

DESAI, J. D. Microbial surfactants: evaluation, types, production and future applications. **Journal of Science and Industrial Research**. v. 46, p. 440 - 449, 1987.

DUBOIS, M., K. A. GILLES.; J. K. HAMILTON.; P..A. REBERS.; and F. SMITH. **Anal Chem.** v. 28, p. 1 - 6, 1956.

EDWARDS JUNIOR, HAYASHI. Structure of a rhamnolipid from *Pseudomona aeruginosa* . **Arch Biochem Biophys**, v. 111, p. 415 – 421, 1965.

FARAH, S.B. **DNA segredos & mistérios**. São Paulo: Sarvier. 1997.276p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2ª ed. Brasília: Embrapa-Cenargen. 1995. 220p.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Biotechnology**, v. 10, p. 208 – 217, 1992.

GEORGIU, G.; LIN S.C.; SHARMA, M. M. Surface active compounds from microorganisms. **Biotechnol.** v. 10, p. 60-65, 1992.

GERSON, D. F. **Biosurfactants: production – properties – applications**. Editado por Naim Kosaric. p. 269 – 286, 1993.

GÖBERT, U.; LANG, S.; WAGNER, F. Sophorose lipids formation by resting cells of *torulopsis bombicola*. **Biotechnol. Lett.**, v. 6, p. 225-230, 1984.

GUERRA-SANTOS, L. H., O.KAPPELI and A. FIETCHER. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 48, p. 301 - 305, 1984.

HOMMEL, R. K. Formation and physiological role of biosurfactant produced by hydrocarbon utilizing microorganisms. **Biodegradation**. v. 1, p. 107-119, 1990.

HOROWITZ, S., J. N. GILBERT and W. M. GRIFFIN. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformes*. **J. Ind. Microbiol.** v. 6, p. 243 - 248, 1990.

ITOH, S., and S. INOUE, **Appl. Environ. Microbiol.** v. 43, p. 1278, 1982.

ITOH, S.; HONDA, H.; TOMIDA, F.; SUZUKI, T. Rhamnolipids produced by *Pseudomona aeruginosa* grow on n-paraffin, **Journal Antibiotic**. , v. 24, p. 855 -859, 1971.

JAIN, D. K., H, LEE and J.T, TREVORS. Effect of addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbon in soil. **J. Ind. Microbiol.** v. 10, p. 87 – 93, 1992.

JARVIS, F. G. and N.J, JOHNSON. A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Am. Chem. Soc.** v. 71, p. 4124, 1949.

JOHNSON, V.; SINGH, M.; SAINI, V. S.; ADHIKARI, D. K.; SITA, V. e YADAV, N. K. (1992). **Biotechnol Letters.** v. 6, p. 487 – 490, 1992.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L. e GRAY, N. C. C. **Biosurfactants and Biotechnology.** New York. 1997.

KOSARIC, N.; GRAY, N.C.C.; CAIRNS, W.L. Biotechnology and the surfactant industry. v. 25, p. 1 - 19, 1987.

KRETSCHMER, A, H. BOCK. And F. WAGNER. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grow on n-alkane. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 44, p. 864 - 870, 1982.

LANG, S ; WAGNER, F. **Structure and properties of biosurfactants.** In: Kosaric, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C (ed.) Biosurfactants and biotechnology, p. 21-47, 1987.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnose lipidis – biosynthesis, microbial production and application potential. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 51, p. 22-32, 1999.

LESIK, O.Y., E.V, KARPENKO.; S.A, ELYSSEEV. AND A.A, TUROVSKY. The surface-active and emulsifying properties of *Candida lipolytica* Y - 919 grown on n-hexadecane. **Microbiol. J.** v. 51, p. 59 - 69, 1989.

LI, Z.Y., S.LANG.; F.WAGNER.; L. WITTE, and V.WRAY. Formation and identification of interfacial - active glycolipids from resting microbial cells of *Arthrobacter* sp. and potential use in tertiary oil recovery. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 48, p. 610 - 617, 1984.

LIN, S.C. Biosurfactants: recent advances. **J.Chem.Tech.Biotechnol.** v. 63, p. 109 - 120, 1996.

LINHARDT, J. R.; BAKHIT, R.; DANIELS, L.; MAYERL, F.; PICKENHAGEN, W. Biotechnology Bioeng. 33 : 365, 1989.

MANULIS, S.; N. KOGAN, REUVEN, M.; Y., BEM-YEPHET. Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum f. sp.*, dianthi from carnation. **Phytopathology**, v. 34, p 28-101, 1993.

MATA-SANDOVAL, J.C.; KARNS, J.; TORRENTS, A. Influence of rhamnolipids and triton X-100 on the biodegradation of three pesticides in aqueous phase and soil slurries. Journ. Agric. Food Chem. v. 49, p. 3296-3303, 2001.

MICHELMORE, R.W.; HULBERT, S.H. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. **Ann. Rev. Phytopathology**, v. 25, p. 384-404, 1987.

MULLIGAN, C.N., F.G, BERNARD. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 55, n. 11, p. 3016 - 3019, 1989.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, p. 371-380, 2001.

NEU, T.R.; DENGLER, T.; JANN, B.; PORALLA, K. Structural studies of an emulsion-stabilizing exopolysaccharide produced by an adhesive, hydrophobic *Rhodococcus* strain. **J. Gen. Microbiol.**, v. 138, p. 2531-2537, 1992.

NEU, T.R.; HARTNER, T; PORALLA, K. Surface active properties of viscosin: a peptidolipid antibiotic. **Appl. Microbiol. Biotech.** v. 32, p. 518-520, 1990.

OBERBREMER, A.; MÜLLER-HURTIG, R. Aerobic stepwise hydrocarbon degradation and formation of biosurfactants by a original soil population in a stirred reactor. **Appl. Microbiol Biotechnology** , v. 31, p. 582 - 586, 1989.

OCHSNER, U.A.; REISER, J. Autoinduced-mediated regulation of rhamnolipids biosurfactant synthesis in *Pseudomonas 5aeruginosa*. **Biochemistry**, v. 92, p. 6424 -6428, 1995.

PARRA, J.L., J. GUINEA.; M. A, MANRESA.; M.ROBERT.; M.E. MERCADE.; F. COMELLES. And M.P, BOSCH. Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 66, p. 141 - 145, 1989.

PERSSON, A.; OSTERBERG, E.; DOSTALEK, M. Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* 278: growth and products characteristics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 1-4, 1988.

POREMBA, K.; W. GUNKEL. Marine biosurfactants-III. toxicity testing with marine microorganisms and comparison with synthetic surfactants. **Z . Naturforsch**, v. 46c, p. 210 - 216, 1991.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S.S. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**. v. 13, p. 133 – 135, 1997.

RAHIM, R.; OCHSNER, U.A.; OLIVEIRA, C.; GRANINGER, M.; MESSNER, P.; LAM, J.S.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. Cloning and functional of the *Pseudomonas aeruginosa* rhIC gene that encodes rhamninosyltransferase 2, an enzyme responsible for d-rhamnolipid biosynthesis. **Molecular Microbiology**, v. 40, p. 708-718, 2001.

RAMANA, K. V., and N. G, KARANTH. Factors affecting biosurfactants production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR - 6 under submerged conditions. **J. Chem Technol. Biotechnol.** v. 45, p. 249 - 257, 1989.

RAPP, P., H. BOCK.; V. WRAY. AND F.WAGNER. Formation, isolation and characterization of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. **J. Gen. Microbiol.** v. 115, p. 491 - 503, 1979.

REIS, F. A. S. **Estudo da síntese de biosurfactante por *Bacillus subtilis*.** 1998. 108f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

REISER, J.; KOCH. A.K.; JENNY, K.; KÄPPELI, O. **Structure, properties and production of biosurfactants.** In: O bringer JW, Tillinghast HS (eds), Biotechnology for Aerospace Applications, **Adv. Appl Biotechnology.** v. 3, p. 85, 1989.

RISTAU, E. and F, WAGNER. Formation of novel anionic trahalose tetraesters from *Rhodococcus erythropolis* under growth limiting conditions. **Biotechnol. Lett.** v. 5, p. 95, 1993.

ROBERT, M.; MERCADE, M.E.; BOSCH, M.P.; PARRA, J.L.; ESPUNY, M.J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotec. Letter**, v. 11, p. 871-874, 1989.

ROSEMBER, M. Bacterial adherence to polystyrene: a replica method of screening for bacterial hydrophobicity. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 42, p. 375, 1981.

ROSEMBERG, E., A, PERRY.; D.T, GIBSON., and D.L, GUTNICK. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG - 1: specificity of hydrocarbon substrate. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 37, p. 409, 1979.

ROSENBERG, E. Microbial surfactants. **C.R.C – Critical Reviews in Biotechnology**, v. 3, p. 109-132, 1986.

SAMBROOK, J., E.F, FRITSCH. And T, MANIATIS. Molecular cloning: A laboratory manual 2nd and Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Ny.

SANTA ANNA, L.M., SEBASTIAN, G.V., MENEZES, E.P. FREIRE, D.M.G. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA 1 isolated in oil environments. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 19, p. 159-166, 2002.

SANTA ANNA, L.M.; SEBASTIAN, G.V; PEREIRA JUNIOR, N.; ALVES, T.M.L.; MENEZES, E.P.; FREIRE, D.M.G. Production of Biosurfactant from a New and Promising Strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 91, p. 459-467, 2000.

SCHEIBENDOGEN. K., R.G, ZYTNER.; H, LEE, and J. T. TRVORS. Enhanced removal of selects hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants and some chemical surfactants. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v. 59, p. 53 - 59, 1994.

SENEATH, P. H AND R.R, SOBRAL. **Numerical taxonomy**. Freeman, San Francisco, 1973.

SIEGMUND. I., AND F. WAGNER. New method for detecting rhamnolipids exerted by *Pseudomonas* species grown on mineral agar. **Biotechnol. Lett.** v. 95, p. 95 - 100, 1993.

THOMAS, C.P., M.L, DURVALL.; E.P, ROBERTSON.; K.B, BARRET, and G.A, BALA. Surfactant based EOR mediated by naturally occurring microorganisms. **Soc. Petroleum Eng. Reservoir Eng.** v. 11, p. 285 - 291, 1993.

WELSH, J., M. McCLELLAND. Fingerprinting using PCR arbitrary primer. **Nucleic Acids Research**. v. 18, p. 7213 – 7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.K., A.R, KUBELIK.; K.J, LIVAK.; J.A, RAFAESK., S.V, TINGEY. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. v. 18, p. 6531 – 6535, 1990.

WITHOLT, B., M.J, DE SMET. J, KINGMA.; J.B, VAN BEILEN., M, KOK.; R.G, LAGEVEEN. And G. EGGINK. **Trends Biotechnol**. v. 8, p. 46 - 52, 1990.

APÊNDICE

7.1 SOLUÇÕES E TAMPÕES

7.1.1 Tampão TAS

Tris-HCl 50mM – 2,5mL; EDTA 50mM – 5,0mL; NaCl 150mM – 1,5mL; pH 8,0.

7.1.2 Tampão TE

Tris-HCl 10mM – 1,0mL; EDTA 1,0 mM - 0,1mL.

7.1.3 Tampão TBE 10X concentrado (Volume completado com água deionizada para 500mL).

Trizma base – 54g; Ácido bórico – 27,5g; EDTA 0,5M – 20mL.

7.1.4 Solução EDTA

EDTA – 9,3g; NaOH – 1,0g; Água deionizada 40 mL.

7.1.5 Solução de Agarose (1,2%)

7.2 Tabela 6 – Caracterização da produção de ramnolípídeo através da formação do halo.

Nº de Acesso da coleção DAUFPE	Linhagens	Fontes de Isolamento	Halo (mm)
521	1A	AP-029	10
573	DA1	AP-044	11
569	D1A1	AP-044	11
615	E2	AP-194	17
572	BB2	AP-044	11
610	A5	AP-194	11
509	G4	AP-029	-
611	B4	AP-194	7
613	C2	AP-194	6
575	D1B2	AP-044	6
570	BA2	AP-044	7
612	C1	AP-194	7

614	D2	AP-194	6
571	D1A2	AP-044	9
568	DB1	AP-044	-

7.3 Tabela 7 – Análise dos parâmetros físico-químicos e biológicos das linhagens estudadas.

Linhagens	Tempo (h)	Ramnose (g L ⁻¹)	Tensão Superficial (mN m ⁻¹)	pH	Glicerol (g L ⁻¹)	Biomassa (g L ⁻¹)
Pseudomona sp E2 (615)	0	-	40,0	6,4	-	0,26
	24	0,45	30,0	6,1	8,85	1,33
	48	0,58	29,3	6,0	3,57	1,41
	72	0,71	29,0	6,1	0,00	1,23
	96	0,54	29,6	6,0	0,00	1,54
P. aeruginosa BB2 (572)	0	-	35,5	6,3	-	0,16
	24	0,21	36,0	6,4	8,15	0,80
	48	0,35	30,0	6,0	3,04	1,49
	72	0,66	30,0	6,0	2,17	1,56
	96	0,43	35,5	6,0	0,00	1,61
Bacillus sp 1A (521)	0	-	35,0	6,0	-	0,22
	24	0,07	29,5	6,6	4,14	0,60
	48	0,07	33,0	5,5	0,00	1,54
	72	0,11	29,5	5,0	0,00	0,87
	96	0,11	30,0	5,8	0,00	0,59
P. aeruginosa A5 (610)	0	-	40,0	6,5	-	0,08
	24	0,06	39,5	6,2	1,34	0,43
	48	0,03	35,0	6,6	0,00	0,47
	72	0,40	38,5	6,4	0,00	0,41
	96	0,07	31,0	6,6	0,00	0,55
P. aeruginosa DA1 (573)	0	-	39,5	6,6	-	0,08
	24	0,04	38,5	6,3	1,17	0,44
	48	0,12	37,0	6,6	0,00	0,46
	72	0,04	35,0	6,4	0,00	0,46
	96	0,03	34,0	6,6	0,00	0,33
P. aeruginosa D1A1 (569)	0	-	41	6,6	0	0,05
	24	0,03	35,5	6,3	1,41	0,45
	48	0,17	40,5	6,6	0	0,41
	72	0,02	40	6,4	0	0,51
	96	0,07	40	6,6	0	0,50