

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE ANTIBIOTICOS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE RAMINOLÍPIDIOS POR BACTÉRIAS ISOLADAS  
DE POÇOS DE PETRÓLEO**

Claudia Juliana Tabosa Lopes de Crasto

Recife-2005

Cláudia Juliana Tabosa Lopes de Crasto

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE RAMINOLÍPIDIOS POR BACTÉRIAS 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  
Orientadoras: Dra. Janete Magali de Araújo  
Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida

Recife-2005

BIOATIVOS PARA OBTENÇÃO  
DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA

**Crasto, Cláudia Juliana Tabosa Lopes de**

**Avaliação da produção de raminolípidios por  
bactérias isoladas de poços de petróleo / Cláudia  
Juliana Tabosa Lopes de Crasto. – Recife : O Autor,  
2005**

Área de concentração: Microbiologia  
Orientador: Dr. Alzir Manoel Paiva de Almeida

**53 folhas : il., tab., fig.**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal  
de Pernambuco. CCB. Biotecnologia de Produtos  
Bioativos, 2005.**

**Inclui bibliografia e anexos.**

**1. Biotecnologia – Microbiologia aplicada. 2.  
Biossurfactantes – Produção de raminolipídios –  
Identificação do metabólito – Caracterização do tipo  
do raminolipídio. 3. Resíduos de petróleo –  
Isolamento das bactérias – Gênero *Pseudomonas* –  
Seleção de mutantes resistentes ao cloranfenicol. I.  
Título.**

**663.1  
660.6**


**200 CDU (2.ed.)  
CDD (22.ed.)**

**UFPE  
BC2005-498**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR CLÁUDIA JULIANA TABOSA LOPES DE CRASTO AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 16 DE AGOSTO DE 2005 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:



Dra. ALZIRA MARIA PAIVA DE ALMEIDA  
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães - FioCruz



Dra. ESTER RIBEIRO GOUVEIA  
Departamento de Antibióticos - UFPE



Dra. ALDA DE ANDRADE CHIPPETA  
Departamento de Farmácia - UFPE

## **DEDICATÓRIA**

Dedico aos meus pais que me  
incentivaram e apoiaram nas horas  
boas e difíceis da minha vida

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela vida e por tudo que me proporciona.

Aos meus pais, Neto e Dôra pelo amor, compreensão, incentivo e apoio durante toda minha vida.

Aos meus irmãos João Paulo, Erika e Paulo Antônio e meus sobrinhos Manuela, Maria Beatriz e João Marcello pelos momentos de alegria e descontração.

A Rodrigo Niskier pelos momentos de carinho, compreensão e paciência a mim concedidos.

A Profa. Dra. Janete Magali de Araújo pela orientação, dedicação e amizade.

A Profa. Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida pela orientação e amizade.

A coordenação da Pós-Biotec pela compreensão.

A todos os professores do Mestrado, pelos ensinamentos e apoio.

Aos amigos de Departamento de Antibióticos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho Orlando, Fátima Regina, Luiz Carlos, Sr. Zeca e Sueli.

Aos colegas de Mestrado, especialmente Denise Azevedo, Laurenir Alves, Manuela Lins e Ulrich Vasconcelos pelos momentos de amizade, descontração, ajuda, apoio e paciência.

Aos amigos Rita, Cynthia, Roberta, Ingrid, Tacyana, Rachelen, Araeska, Mariana e Anna Luiza pelo carinho e amizade que sempre me dedicaram.

Aos amigos Danilo Mamede e Carla Maciel pela amizade e apoio que sempre me dedicaram.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1-</b> Estrutura química do Raminolípido RL2 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (THAZIBI <i>et al.</i> , 2004).....	11
<b>Figura 4.1-</b> Esquema do teste de gradiente em placa.....	20
<b>Figura 5.1-</b> Formação de halos azuis pelas linhagens UFPEDA-610 e UFPEDA-612.....	22
<b>Figura 5.2-</b> Tensão superficial das seis linhagens em meio MLR mais glicerol, cultivadas sob agitação durante 96 horas.....	23
<b>Figura 5.3-</b> Concentração de raminose das seis linhagens cultivadas em meio MLR mais glicerol.....	25
<b>Figura 5.4-</b> Biomassa obtida durante a fermentação em meio MLR mais glicerol como fonte de carbono.....	26
<b>Figura 5.5-</b> Tensão superficial das seis linhagens em meio MLR mais petróleo bruto cultivadas sob agitação durante 236 horas.....	27
<b>Figura 5.6-</b> Concentração de raminose (g/L) das seis linhagens cultivadas no meio MLR mais petróleo bruto, durante 236 horas de fermentação.....	27
<b>Figura 5.7-</b> Tensão superficial das seis linhagens resistentes ao cloranfenicol em meio MLR mais glicerol, cultivadas sob agitação durante 120 horas.....	29



**Figura 5.8-** Concentração de raminose das seis linhagens resistentes ao cloranfenicol em meio MLR mais glicerol, cultivadas sob agitação durante 120 horas.....30

**Figura 5.9-** Separação de Mono-raminose (M) e di-raminose (D) por cromatografia em camada delgada (TLC) das linhagens (1): UFPEDA – 569, (2): UFPEDA-571, (3): UFPEDA-572, (4): UFPEDA-612, (5): UFPEDA-613 e (6): UFPEDA-614.....32

**Figura 5.10-** Ilustração da linhagem UFPEDA-614 no meio Caldo Asparagina e no meio Caldo Acetamida.....33

**Figura 5.11-** Pigmentos fluoresceína e piocianina produzidos pelas linhagens UFPEDA-569, 571 e 572.....34

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1-</b> Diversidade de surfactantes de origem microbiana (MULLIGAN <i>et al.</i> , 2001).....	5
<b>Tabela 4.1-</b> Culturas da coleção do Departamento de Antibióticos - UFPEDA - utilizadas no estudo .....	16
<b>Tabela 5.1-</b> Comparação da Tensão superficial final das linhagens cultivadas por 96 horas nos meios MLR + glicerol e MLR + glicose.....	24
<b>Tabela 5.2 –</b> Linhagens resistentes a diferentes concentrações de cloranfenicol.....	28
<b>Tabela 5.3-</b> Aumento (número de vezes) da concentração de raminose das linhagens parentais e dos mutantes resistentes no meio de fermentação MLR mais glicerol .....	31

## RESUMO

Microrganismos produtores de biossurfactantes podem crescer em substratos solúveis ou insolúveis em água. Os biossurfactantes formam moléculas anfipáticas, que auxiliam a formação de emulsões e disponibilizam compostos à célula microbiana. Durante a realização deste trabalho, foi avaliada a produção de raminolipídeo, utilizando duas fontes de carbono, foi realizado a caracterização do raminolipídeo se é mono ou di-raminolipídeo, foi obter mutantes resistentes ao cloranfenicol com alta produção de raminolipídeo e foi realizada a identificação dos pigmentos. As seis linhagens positivas para produção de raminolipídeo, foram utilizadas para produção do biossurfactante em meio MLR contendo glicerol (2%) e/ou petróleo bruto (5%) como fonte de carbono. Destas a menor tensão superficial (37,7 mN/m) e a maior produção de raminose (1,4 g/L) foram observadas após 10 dias de fermentação com a linhagem UFPEDA – 569 no meio MLR contendo petróleo. Foi observado também que as linhagens UFPEDA- 571 e UFPEDA- 612 se destacaram por produzirem raminose na concentração de 1,9 g/L e 1,2 g/L respectivamente em meio MLR mais glicerol com tensão superficial de 52,9 mN/m e 53,7 mN/m. O biossurfactante produzido por estas linhagens foi identificado como mono-raminolipídeo, através da cromatografia em camada delgada, e as linhagens (UFPEDA-572, 613 e 614) produziram di-raminolipídeo, com duas raminoses na sua estrutura. Não foi evidenciada alteração significativa do pH em nenhum dos meios utilizados. Todas as linhagens foram identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* através dos meios Caldo Asparagina e Caldo Acetamida. Os métodos utilizados neste trabalho para quantificação do biossurfactante raminolipídico foram satisfatórios para estudo da diversidade microbiana, não excluindo as bactérias para uso em biorremediação de ambientes poluídos por petróleo e seus derivados.

## ABSTRACT

Biosurfactant producing microorganisms can grow in water-soluble or non-water-soluble substrates yielding amphiphilic molecules assisting on emulsion formation and on availability of these composites to the microbial cell. During the accomplishment of this work it was evaluated the rhamnolipid production using two sources of carbon, the characterization between mono- or di-rhamnolipid, the attainment of chloranfenicol resistant mutants with high production of rhamnolipid beyond of the bacteria identification. Six rhamnolipid production test positive strains were used for production of the biosurfactant in MLR medium containing glycerol (2%) and/or crude oil (5%) as source of carbon. The lowest superficial tension (37,7 mN/m) and the highest production of rhamnose (1,4 g/L) were observed after 10 days of fermentation in the UFPEDA-569 strain in MLR plus oil medium. It was also observed that UFPEDA-571 and UFPEDA-612 strains were detached by rhamnose production under 1,9 g/L and 1,2 g/L concentration respectively in MLR plus glycerol medium and superficial tension of 52,9 mN/m and 53,7 mN/m. The biosurfactant produced by these strains was identified as a mono-rhamnolipid through the chromatography in thin layer (TLC). Other strains (UFPEDA-572, 613 and 614) produced di-rhamnolipidic surfactant with two rhamnose in the structure. It was not observed significantly pH alteration on neither of the used medium. All strains were identified as *Pseudomonas aeruginosa* by Asparagine broth and Acetamide broth. The methods used in this work for quantification of rhamnolipidic biosurfactant were satisfactory for study of microbial diversity, not excluding the bacteria for bioremediation usage and on oil or oil derivated polluted environments.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	
LISTA DE TABELAS.....	
RESUMO.....	
ABSTRACT.....	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Biossurfactantes.....	4
3.1.1 Atividades dos Biossurfactantes.....	7
3.1.2 Aplicações dos Biossurfactantes.....	8
3.1.3 Raminolipídeos.....	10
3.1.4 Gênero <i>Pseudomonas</i> .....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Bactérias.....	16
4.2 Condições de Cultivo.....	16
4.2.1 Meios de Cultivo.....	17
4.3 Ensaio Primário.....	18
4.4 Ensaio Secundário – Produção de Raminolipídeos.....	18
4.5 Caracterização do Raminolipídeo.....	19
4.5.1 Cromatografia em Camada Delgada (TLC).....	19
4.6 Seleção de bactérias Resistentes ao Cloranfenicol.....	20
4.7 Identificação das Culturas.....	21
4.8 Identificação de Pigmentos em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.1 Ensaio Primário.....	22
5.2 Ensaio Secundário – Produção de Raminolipídeos em meio	

líquido.....	23
<b>5.3 Seleção de Bactérias Resistentes ao Cloranfenicol.....</b>	<b>28</b>
<b>5.4 Caracterização dos Raminolipídeos.....</b>	<b>31</b>
<b>5.5 Identificação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</b>	<b>32</b>
<b>5.6 Identificação de Pigmentos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>35</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>36</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>48</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são metabólitos produzidos por diversos microrganismos, particularmente bactérias, que podem utilizar substratos solúveis em água como glicose e glicerol, ou insolúveis como: hidrocarbonetos, gorduras e ácidos graxos. Como os surfactantes químicos, os biossurfactantes podem ser usados em processos que envolvam emulsificação, detergência, floculação e dispersão ou solubilização. Entretanto, os biossurfactantes apresentam algumas vantagens, sobre os surfactantes químicos, tais como baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e melhor compatibilidade ambiental.

Os surfactantes químicos causam problemas ecológicos em decorrência de sua resistência à degradação, além de apresentarem diferentes graus de toxicidade, sendo toxicidade dependente da estrutura química (KANTIN, 1980).

A indústria petrolífera vem utilizando microrganismos ou seus produtos para aumentar a recuperação do petróleo, sendo este processo conhecido como MEOR – (Microbial Oil Recovery Enhancement) - o qual apresenta vantagens importantes com relação aos métodos convencionais. A aplicação de biossurfactantes é uma estratégia importante, uma vez que altera algumas características físico-químicas do petróleo, facilitando ou aumentando a sua produção nos poços, além de apresentar inúmeras vantagens ecológicas (FIECHTER, 1992)

Os biossurfactantes, além da aplicação na recuperação do petróleo, também tem aplicação na formulação de herbicidas e pesticidas para a agricultura, na indústria alimentícia, como aditivo em condimentos, e ainda nas indústrias farmacêutica, têxtil e cosmética (YAMANE, 1987; LIN *et al.*, 1993; SHEPHORD *et al.*, 1995).

Os biossurfactantes glicolipídicos consistem de carboidratos hidrofílicos e longas cadeias de ácidos alifáticos ou ácido hidroxialifático, sendo a classe mais comum de compostos de superfície ativa, produzida por diversos microrganismos. Neste grupo são encontrados os raminolipídeos, que são produzidos por muitas bactérias entre elas *Pseudomonas*, que apresentam uma grande propriedade de superfície ativa, quando cultivadas sobre diferentes fontes de carbono (SIM *et al.*, 1997).

A produção e a caracterização de biossurfactante raminolipídico é uma estratégia importante em decorrência da sua aplicação biotecnológica que pode ser utilizada para biorremediação de áreas impactadas ou para aumentar a produção terciária de petróleo (MEOR).



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a produção de raminolipídeos por bactérias isoladas de poços de petróleo, obter mutantes resistentes ao cloranfenicol e caracterizar o tipo de raminolipídeo produzido.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar e quantificar a produção de raminolipídeos pelas bactérias utilizando petróleo bruto e/ou glicerol como fontes de carbono;
- Selecionar mutantes resistentes ao cloranfenicol;
- Caracterizar o tipo de raminolipídeo produzido por cromatografia em camada delgada;
- Identificar quais os pigmentos produzidos pelas diferentes bactérias.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Biossurfactantes

Os surfactantes representam uma importante classe de compostos químicos que se caracterizam por apresentarem moléculas anfipáticas, constituídas por porções hidrofílicas e hidrofóbicas, que em função da presença destes grupos, tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluídas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). Em decorrência destas propriedades, estes compostos reduzem a tensão superficial e interfacial, formam microemulsões com os hidrocarbonetos, proporcionando uma grande diversidade de aplicações industriais (PALEJWALA & DESAI, 1989).

O mercado mundial de surfactante, atinge mais de 9,4 bilhões de dólares por ano e segundo Desai & Banat (1997), a sua demanda aumenta a uma velocidade superior a 35%.

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente, são obtidos por síntese química a partir de derivados de petróleo. Entretanto, sua aplicação e utilização podem causar impacto ambiental, uma vez que são tóxicos e não biodegradáveis o que tem levado ao desenvolvimento de pesquisas na busca de surfactantes naturais como alternativa a produtos sintéticos existentes (DESAI & BANAT, 1997).

A liberação de hidrocarbonetos no meio ambiente através de atividades industriais ou acidentes de derramamento de petróleo em ambientes marinhos, vêm causando grandes impactos ambientais (IQBAL *et al.*, 1995).

Uma das alternativas para a remediação destas áreas impactadas é a aplicação de surfactantes para a emulsificação do hidrocarboneto, o que permite o acesso microbiano, desencadeando a atividade dos microrganismos hidrocarbonoclásticos (BANAT, 1995).

O uso de biossurfactantes constituem uma tecnologia promissora, uma vez que estes compostos são biodegradáveis e não causam toxicidade ao ambiente, o que tem levado ao desenvolvimento de várias pesquisas na busca de surfactantes naturais, como alternativa aos produtos sintéticos existentes (LIN *et al.*, 1996).

Vários compostos com propriedades tenso-ativas são sintetizados por organismos vivos, desde plantas (saponinas) até microrganismos (glicolipídeos) e também no organismo humano como os sais biliares que são considerados surfactantes naturais (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes e consistem de produtos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (FIECHTER, 1992).

Os biossurfactantes constituem uma das principais classes de surfactantes naturais. Diferentemente dos surfactantes sintéticos, que são classificados pela natureza do seu grupo polar, os biossurfactantes são colocados dentro de categorias, de acordo com a composição química e sua origem microbiana (DESAI & DESAI, 1993).

As principais classes destes compostos incluem glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos além de surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1-** Diversidade de surfactantes de origem microbiana (MULLIGAN *et al.*, 2001).

Biossurfactantes	Microrganismos	Referência
Lipopeptídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>	Horowitz <i>et al.</i> , 1990
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	Arima <i>et al.</i> , 1968
Raminolipídeo	<i>Bacillus sp.</i>	Banat, 1993
Soforolipídeo	<i>Candida bombicol</i>	Gobbert <i>et al.</i> , 1984
Soforolipídeo	<i>Candida lipolytica</i> Y-917	Lesik <i>et al.</i> , 1989
Fosfolipídeo	<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Akit <i>et al.</i> , 1981
Raminolipídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Robert <i>et al.</i> , 1989
Lipopeptídeo	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Neu <i>et al.</i> , 1990
Glicolipídeo	<i>Rhodococcus sp.</i>	Abu-Ruwaid <i>et al.</i> , 1991

Em geral, a estrutura química dos biossurfactantes é constituída por uma parte hidrofílica, composta de aminoácidos ou peptídeos, ânions ou cátions, mono, di, ou polissacarídeos, e a porção hidrofóbica freqüentemente composta de ácidos graxos saturados, insaturados ou hidroxilados, ou ainda composta de peptídeos anfifílicos ou hidrofílicos (GEORGIU *et al.*, 1992).

Fiechter (1992) e Willumsen & Karlson (1997) dividem os biossurfactantes em duas categorias: na primeira categoria encontram-se os biossurfactantes de baixo peso molecular que compreendem os glicolipídeos, soforolipídeos, lipídeos de trealose, ácidos graxos e fosfolipídeos os quais se caracterizam pela capacidade de baixar a tensão superficial, enquanto na segunda categoria se encontram os polímeros de alto peso molecular, tais como os bioemulsificadores, polissacarídeos anfipáticos. Nestes, necessariamente não são encontradas as duas partes, hidrofóbica e hidrofílica. Cooper & Zajic (1980) relatam que em meio aquoso os bioemulsificadores afetam a formação da emulsão e da sua estabilidade, e às vezes reduzem a tensão superficial.

Os biossurfactantes freqüentemente estão relacionados com a absorção de hidrocarbonetos, além de serem sintetizados predominantemente por microrganismos degradadores de hidrocarbonetos. Entretanto alguns biossurfactantes também podem ser produzidos em meios de cultura, utilizando compostos solúveis em água como glicose, sacarose, glicerol, etanol (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1986; COOPER & GOLDENBERG, 1989).

A estrutura química dos biossurfactantes em geral apresenta uma porção lipofílica usualmente composta por cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados á uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato. A maioria dos biossurfactantes, são neutros ou aniônicos variando desde pequenos ácidos graxos à grandes polímeros (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998 e BOGNOLO, 1999).

Os biossurfactantes apresentam vantagens de serem sintetizados a partir de substratos renováveis e de possuírem uma grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular. A modificação da estrutura química e

das propriedades físicas dos biossurfactantes através de manipulações genéticas ou químicas permite o desenvolvimento de produtos para necessidades específicas (DESAI & BANAT, 1997).

### **3.1.1 Atividades dos Biossurfactantes**

Os biossurfactantes apresentam diferentes atividades que podem ser determinadas através da mudança da tensão superficial e interfacial, estabilização ou desestabilização de emulsões e também pelo (HLB) balanço hidrofílico-lipofílico (DESAI & BANAT, 1997).

Segundo Mulligan & Gibbs, (1993) as características básicas essenciais de um bom surfactante são eficiência e efetividade. A eficiência pode ser determinada através da concentração de micelas críticas (CMC) que varia de 1 a 2000 mg/L e a efetividade está relacionada com as tensões superficiais e interfaciais.

Para avaliar a atividade surfactante um dos índices mais utilizados é a concentração de micelas críticas (CMC) que é o efeito da solubilidade de um surfactante na fase aquosa. Segundo Lin (1996) e Desai & Banat, (1997) em altas concentrações do biossurfactante a redução da tensão superficial atinge níveis críticos, acima dos quais moléculas anfifílicas se associam para formar estruturas supramoleculares como micelas, bicamadas e vesículas. As forças que prendem estas estruturas incluem interações hidrofóbicas, força de Van der Waals, forças eletrostáticas e pontes de hidrogênio (GEORGIU *et al.*, 1992).

A formação de micelas pode resultar na solubilização do óleo ou da água em outras fases, dando origem a microemulsões (GEORGIU *et al.*, 1992). Segundo Desai & Banat (1997) a tensão superficial da água é 72 mN/m e a adição de biossurfactante baixa este valor para 30 mN/m indicando que esse produto apresenta uma boa atividade.

### 3.1.2 Aplicações dos Biossurfactantes

A maioria dos biossurfactantes possui algumas características comuns que conferem vantagens sobre os surfactantes convencionais como: a atividade superficial e interfacial destes compostos, são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais (detergentes aniônicos sulfatados), uma vez que produzem menor tensão superficial em menores concentrações e a concentração de micelas critica (CMC) dos biossurfactantes (medida de eficiência) varia entre 1-2000 mg/L enquanto que a tensão interfacial (óleo/água) e superficial fica em torno de 1 e 30 mN/m (BOGNOLO, 1999).

Em relação á biodegradabilidade, ao contrário dos surfactantes químicos, os biossurfactantes são facilmente degradáveis na água e no solo, se apresentam altamente adequados para aplicações na biorremediação e no tratamento de resíduos contaminados por pesticidas e por petróleo (MULLIGAN & GIBBS, 1993).

A baixa toxicidade dos biossurfactantes permite sua utilização em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (CAMEOTRA & MAKAR, 1998; FLASZ *et al* (1998);

Segundo Desai & Banat, (1997) a recuperação do petróleo utilizando biossurfactantes, constitui atualmente uma importante estratégia para a indústria do petróleo, uma vez que microrganismos e produtos de seu metabolismo são utilizados para aumentar a recuperação do petróleo terciário. Este processo conhecido como MEOR (Microbial Oil Recovery Enhancement) , aumento da recuperação do óleo por microrganismos, apresenta vantagens importantes em relação aos métodos convencionais. Os surfactantes alteram algumas características físico-químicas do petróleo, facilitando ou aumentando a sua produção nos poços (FIECHTER, 1992).

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

Os biossurfactantes são necessários, para aplicação na agricultura, construção civil, produção de plásticos, estabilização de alimentos e bebidas, além de ser utilizados em cosméticos e nas indústrias de couro, papel e metal.

A utilização de microrganismos produtores de biossurfactantes para indústria petrolífera, como o aumento da recuperação do petróleo – MEOR – *in situ* requer que os agentes produtores apresentem algumas características diferentes. Segundo KHIU & KHAN (1994) microrganismos para MEOR devem tolerar altas temperaturas, pH ácido ou alcalino, salinidade e pressão, além de crescer em condições anaeróbias ou microaerófilas.

Clark & Kline, (1981) relatam que 50-70% dos poços de petróleo nos Estados Unidos suportam crescimento microbiano com pH entre 4-8, temperaturas de 75°C e salinidade de 10%.

Tem sido observada uma ampla utilização de biossurfactantes na indústria do petróleo, particularmente na degradação de hidrocarbonetos (BANAT, 1995), biorremediação de solos contaminados por metais pesados (MULLIGAN *et al.*, 2001), e biodegradação de pesticidas (MATA-SANDOVAL *et al.*, 2001).

No entanto o emprego de biossurfactantes tem sido limitado a algumas aplicações restritas pelo fato de seu uso não ser economicamente competitivo. Sua aplicação comercial é determinada pelo seu custo e propriedades em relação ao surfactante sintético. Uma solução seria a maior exploração da fisiologia, bioquímica e genética das linhagens produtoras de biossurfactantes, visando a melhoria do processo tecnológico com redução dos custos de produção (FIECHTER, 1992).

Atualmente inúmeros casos de derramamento de petróleo em área costeira têm causado várias catástrofes ecológicas e sociais. A capacidade emulsificadora dos biossurfactantes tem contribuído para acelerar a degradação dos hidrocarbonetos no ambiente e assim os biossurfactantes se apresentam como um poderoso instrumento no controle da poluição ambiental (ATLAS & BARTHA, 1992; ATLAS, 1993; BERTRAND *et al.*, 1994).

Outra característica importante dos biossurfactantes é um papel importante na área médica uma vez que também apresentam atividade antimicrobianas incluindo

antifúngica, antibacteriana, antimicoplasma e antiviral além da aplicação preventiva para retardar o crescimento de biofilmes patogênicos em cateteres e outros materiais médicos insercionais, levando a diminuição de infecções hospitalares sem a necessidade de fármacos ou agentes químicos sintéticos (SINGH & CAMEOTRA, 2004). Eles têm sido usados para transfecção gênica (NAKANISHI, 2003), adjuvantes para antígenos (MITTENBUHLER, 1997), uso como probiótico (BENGMARK, 1998), inibidores da formação da rede de fibrina e ativadores da via de fibrinólise (KIKUCHI & HASUMI, 2002). Um dos mais benéficos usos dos biossurfactantes é como antiadesivos (SINGH & CAMEOTRA, 2004).

Alguns compostos apresentam propriedades antibióticas que atuam rompendo a membrana do microrganismo. Dentro deste grupo são encontrados os lipopeptídeos da família Inturin produzido por *Bacillus subtilis* que apresentam propriedades antifúngicas (SANDRIN *et al.*, 1990; THIMON *et al.*, 1992); *Candida antartica* que apresenta atividade antimicrobiana (KITAMOTO *et al.*, 1993) e *Bacillus licheniformis* que inibe bactérias, fungos filamentosos e leveduras (FIECHTER, 1992)

### 3.1.3. Raminolipídeos

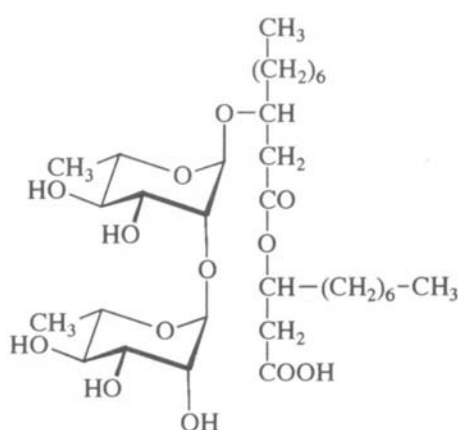
Raminolipídeos são surfactantes naturais denominados biossurfactantes, que são produzidos por microrganismos que têm a propriedade de crescer em substratos solúveis ou insolúveis.

A grande variedade de estruturas é uma característica dos biossurfactantes, onde se observa: glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros (GEORGIOU *et al.*, 1992). Entre os diversos tipos os biossurfactantes glicolipídicos são constituídos por carboidratos em combinação com longas cadeias de ácidos alifáticos ou ácidos hidroxialifáticos. Entre os glicolipídeos, os mais conhecidos são os raminolipídeos, trehalolipídeos e soforolipídeos. Uma espécie microbiana, dependendo da fonte de carbono disponível no processo de fermentação, pode produzir diferentes tipos de glicolipídeos (DESAI & BANAT, 1997).



A produção de glicolípido contendo raminose foi inicialmente observada por Jarveis & Johnson em 1949, através da fermentação de *Pseudomonas pyocyanea* tendo glicose como fonte de carbono. Segundo Thazibi (2004) na década de 60 Bergstrom *et al.*, (1946) determinaram a via biossintética do biossurfactante raminolípido que ocorre por transferência seqüencial do raminosil, enquanto OCHSNER *et al.*, (1994) identificaram e caracterizaram um gene envolvido na regulação da biossíntese do raminolípido produzido por *P. aeruginosa*. A estrutura química do raminolípido só foi elucidada por Edwards & Hayashi (1965) que demonstraram a ligação 1,2  $\beta$  – hidroxidecanoil –  $\beta$  - hidroxidecanoato, após oxidação e metilação com periodato (Figura 3.1).

*P. aeruginosa* pode produzir quatro diferentes homólogos de raminolípido, os quais são caracterizados por uma ou duas unidades de L-raminose e uma ou duas unidades do ácido  $\beta$ -hidroxidecanoico. O raminolípido L-raminosil-Lraminosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato (RL2) é um dos principais raminolípidos produzido por *P. aeruginosa*, assim como o RL 3, enquanto o L-raminosil- $\beta$ - hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato (RL1) e o RL 4 (mono-raminolípido) são produzidos sob determinadas e únicas condições de cultivo (THAZIBI *et al.*, 2004).



**Figura 1-** Estrutura química do Raminolípido RL2 de *Pseudomonas aeruginosa* THAZIBI *et al.*, (2004).

Os raminolipídeos produzidos por *Pseudomonas* spp. possuem a capacidade de diminuir a tensão interfacial contra n-hexadecano para 1 mN/m e a tensão superficial para 25 a 30 mN/m (LANG & WAGNER, 1987).

Trehalolipídeo é um glicolipídeo produzido por diferentes gêneros de actinomicetos (LI *et al.*, 1984 e GÖBBERT *et al.*, 1984) e tem sua estrutura química constituída por ácido micólico, ligado ao dissacarídeo trealose. O ácido micólico é um ácido  $\beta$ -hidroxicarboxílico de cadeia longa cujo tamanho, estrutura e grau de insaturação vai depender se o microrganismo produtor é: *Rhodococcus*, *Nocardia* e *Corynebacterium* (COOPER & PADOCK, 1979, KRESTCHEMER *et al.*, 1982).

Segundo Desai & Banat, (1997) os trehalolipídeos 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 trehalolipídeos produzidos por diferentes espécies de actinomicetos são influenciados pelas condições de cultivo.

Soforolipídeo é um glicolipídeo produzido por leveduras do gênero *Torulopsis* constituído por um dissacarídeo soforose, acetilado no carbono 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 & INOUE, 1982).

O crescimento de microrganismos em meios de cultura contendo fonte de carbono hidrofóbica como hidrocarbonetos induzem a produção de raminolipídeo (BANAT *et al.*, 2000). Alguns autores (LANG & WULLBRANDT, 1999, RAHMAN *et al.*, 2002) relatam que as condições ambientais, a natureza do substrato e a fase de crescimento, também influenciam na síntese do raminolipídeo. Os substratos utilizados por microrganismos para produção de raminolipídeos incluem alcanos, piruvato, glicerol, succinato, frutose, óleo de oliva, glicose, manitol, sais e elementos de traço (MULLIGAN *et al.*, 2001). Em geral, estes biossurfactantes aniônicos são produzidos pelo gênero *Pseudomonas* e apresentam uma grande aplicação na indústria do petróleo (DESAI, 1987; DESAI & BANAT, 1997).

Os biossurfactantes excretados no meio de cultura pelas diversas espécies de *Pseudomonas* constituem uma mistura complexa de diferentes raminolipídeos (DÉZIEL

*et al.*, 2000). A estrutura destes glicolídeos tem sido largamente estudada (DESAI & BANAT, 1997; LANG & WULBRANDT, 1999; SIM *et al.*, 1997). Estudos cromatográficos e análises de espectrometria de massa dos raminolídeos produzidos por linhagens de *P. aeruginosa* permitiram a identificação e a relativa quantificação de 28 diferentes homólogos (BENINCASA *et al.*, 2004).

A determinação quantitativa do raminolípido indicará a produtividade do raminose. Portanto, a caracterização qualitativa indicando se o raminolípido é mono ou di-raminolípido é importante para determinação da produtividade.

O melhoramento de *Pseudomonas* para aumentar a produtividade de biossurfactante raminolípido, constitui uma abordagem importante e, segundo Mulligan *et al.*, (1989), *P. aeruginosa* resistente ao cloranfenicol produz dez vezes mais raminolípido que a linhagem parental.

A atividade de superfície dos raminolídeos RL1-RL4 em diferentes soluções aquosas foi estudada em função da concentração do eletrólito e do pH (SYLDATK *et al.*, 1985). A tensão superficial deste biossurfactante raminolípido atinge aproximadamente 30mN/m e a concentração de micelas críticas mudam no intervalo de 0.01-0.4 milímetros dependendo da estrutura do raminolípido (MATA-SANDOVAL *et al.*, 2001).

#### **3.1.4. Gênero *Pseudomonas***

O gênero *Pseudomonas* pertence à ordem *Pseudomonadales*, família *Pseudomonadaceae*, composto por cerca de 128 espécies, divididas em grupos de espécies próximas, e o gênero mais importante do ponto de vista clínico e ambiental (ANZAI *et al.*, 2000).

Morfológicamente esta bactéria apresenta bastonetes Gram-negativos isolados ou em cadeias curtas com motilidade, possuem um ou vários flagelos polares monotríquios, são aeróbicos facultativos e em alguns casos crescem anaerobicamente quando usam como aceptor de elétrons o nitrato. São quimiorganotróficas e muitas espécies são quimiolitotróficas, podendo usar H<sub>2</sub> ou CO como fonte de energia.

Algumas espécies acumulam poli- $\beta$ -hidroxibutirato, como material de reserva e podem crescer entre 37° e 47°C (HOLT *et al.*, 1994; BROOKS, *et al.*, 2000).

Segundo Freitas & Barth, (2004) a cor das colônias em placa varia de acordo com o tipo de pigmento produzido, geralmente são azul-esverdeadas, podendo também ser marrom ou mesmo não produzir pigmento. Outros pigmentos produzidos são a pioverdina (amarelo-esverdeado), piomielina (marrom) e aeruginosina (vermelho). Destes o último segundo Ramalho *et al.*, (2002), deriva da palavra grega *aerugo* (ferrugem) por conta do pigmento vermelho (aeruginosina). Em presença de sulfato ferroso ocorre produção de um pigmento marrom escuro e em altas concentrações de sais de potássio aumenta a evidenciação de pigmento esverdeado. Ramalho *et al.*, (2002)

Freitas & Barth, (2004) enfatizam que mais de 90% das linhagens produzem os pigmentos piocianina e fluoresceína, que se caracterizam pela cor azul-esverdeada das colônias quando cultivadas em ágar (TSORAEVA & MARTÍNEZ, 2000). Sais de magnésio e potássio auxiliam a sua produção (RAMALHO *et al.*, 2002) enquanto que dextrose e maltose aumentam o crescimento da colônia e reprimem a biossíntese de pigmento (CHEN *et al.*, 1996).

Para identificação da espécie, são utilizados vários testes bioquímicos entre os quais destacam-se: catalase, oxidase, fermentação da arginina, hidrólise da gelatina, hidrólise da caseína, hemólise, degradação de açúcares entre outros (TSORAEVA & MARTÍNEZ, 2000).

As piocinas são proteínas (bacteriocinas) de ação bactericida de pequeno espectro que são liberadas durante lise celular e quando absorvidas especificamente pela superfície das bactérias susceptíveis, provocam sua morte (MICHEL-BRIAND & BAYSSE, 2002). As piocinas, exercem sua toxicidade através da degradação não específica do DNA de células sensíveis. A grande quantidade dessas moléculas na espécie oferece um importante papel competitivo entre as bactérias. Há três tipos de piocinas na PA 01: tipo R, tipo F e tipo S (PARRET & DE MOT, 2002).

Tsoraeva & Martínez, (2000) relatam que o isolamento e identificação de *P. aeruginosa* podem ser realizados em dois meios de cultura: Caldo Asparagina que

permite caracterizar a produção de pigmento fluorescente e Caldo Acetamida que utiliza este composto como fonte de carbono e nitrogênio produzindo amônia e ácido acético alcalinizando o meio e proporcionando a caracterização da presença de *Pseudomonas*. Para a caracterização de *P. aeruginosa* o meio Agar Cetrimida promove a produção do pigmento fluorescente.

Reyes, (1981) enfatiza que *P. aeruginosa* é o único organismo conhecido capaz de produzir o metabólito secundário chamado piocianina, que é um pigmento solúvel em água e também considerado um fator de virulência da bactéria. Tredget *et al.*, (2004) mostram que a principal função da piocianina é extrair íon ferro e nutrientes para sobrevivência.

Tais microrganismos produzem biossurfactantes que não podem ser selecionados através da atividade hemolítica como acontece com o grupo de *Bacillus*. Esta dificuldade decorre da presença de  $\beta$ - hemolisina em *Pseudomonas* que hidrolisa o ágar sangue (SIEGMUND & WAGNER, 1991).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Bactérias

Foram utilizadas seis culturas bacterianas isoladas de poços de petróleo do Canto do Amaro/RN, e pertencentes à Coleção de Culturas de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1-** Culturas da coleção do Departamento de Antibióticos – UFPEDA - utilizadas no estudo

Nº UFPEDA	Código	Fonte de isolamento *
569	D1A1	AP 044
571	D1A2	AP 044
572	BB2	AP 044
612	C1	AP 194
613	C2	AP 194
614	D2	AP 194

\* Poços de petróleo do Canto do Amaro/RN

### 4.2 Condições de Cultivo

Todas as bactérias foram cultivadas em meio MPK *Pseudomonas* de King (KING *et al*,1954) e Triptona Soy Agar, em frascos de Wheaton (tipo penicilina) à temperatura de 30°C por 48 horas. Em seguida foi adicionado 3ml de óleo mineral esterilizado aos frascos, que foram fechados com selo de alumínio e depositados na Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA).

#### 4.2.1 Meios de Cultivo

A composição dos meios está descrita abaixo.

- Meio *Pseudomonas* de King-MPK-(King *et al.*, 1954), em g/L: Triptona 10; Proteose peptona 10;  $K_2HPO_4$  1,5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1,5 pH 7,0-7,2
- Triptona de soja Ágar-TSA- em g/L: Trypticase 15; NaCl 5; Peptona de soja 5; ágar 15.
- Meio Mineral Raminolipídico (MMR) segundo a metodologia de Siegmund & Wagner, (1991), em g/L:  $KH_2PO_4$  0,7;  $Na_2HPO_4$  0,9;  $NaNO_3$  2,0;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,4;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0,1; solução de elemento traços\* 2,0 mL; Cetiltrimetilamônio brometo 0,2; azul de metileno 0,005; Agar 15; pH 6,5-7,0.

\*Solução de elementos traços (g/L):  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  2,0;  $MnSO_4 \cdot H_2O$  1,5;  $(NH_4)_6 MnO_7 \cdot 4 H_2O$  0,6.

- Meio MLR segundo Abu-Ruwaida *et al.*, (1991) em g/L:  $NaHPO_4$  2,2;  $K_2HPO_4$  1,4;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,6;  $(NH_4)_2SO_4$  3,0; NaCl 0,05;  $CaCl_2$  0,02;  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$  0,01; solução de sais\* 0,001 mL. pH 6,8.

\* Solução de sais (mg/L):  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  525;  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  200;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  705;  $Na_2MOO_4 \cdot 2H_2O$  15;  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  200;  $H_3BO_3$  15;  $NiSO_4 \cdot 6H_2O$  27.

- Caldo Asparagina em g/L: asparagina 4;  $KH_2PO_4$  2;  $K_2HPO_4$  20 ;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1; glicerol 16 mL; pH 6,9 a 7,2.
- Caldo Acetamida em g/L: acetamida 10; NaCl 5;  $KH_2PO_4$  1,39;  $K_2HPO_4$  0,73; vermelho de fenol 0,012; pH 6,9 a 7,2.
- Meio MPA-FI *Pseudomonas* Agar Fluoresceína (KING *et al.*, 1954) em g/L: Tryptona 10; Proteose peptona 10;  $K_2HPO_4$  1,5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1,5; Glicerol 10; Agar 15; pH 7,0.
- Meio MPA-Pio *Pseudomonas* Agar Piociana (KING *et al.*, 1954) em g/L: Peptona 20;  $MgCl_2$  1,4;  $K_2SO_4$  10; Glicerol 10; Agar 15; Água destilada 1 L; pH 7,0.

### **4.3 Ensaio Primário**

Para caracterização do biossurfactante, foi utilizado teste semi-quantitativo em placa com cetiltrimetilamônio e um corante básico (azul de metileno) segundo a metodologia descrita por Siegmund & Wagner (1991). O biossurfactante aniônico forma um par iônico insolúvel em presença do cetiltrimetilamônio brometo, mais azul de metileno. A composição do meio utilizado está descrita no item 4.2.1.

### **4.4 Ensaio Secundário - Produção de Raminolipídeo**

Para produção do raminolipídeo, foi utilizado o meio líquido MLR segundo Abu-Ruwaida *et al.*, (1991) cuja composição está descrita no item 4.2.1, tendo como fontes de carbono, glicerol (2%) e/ou petróleo bruto (5%). Durante a fermentação foram avaliados: tensão superficial, crescimento celular e produção de raminolipídeo, através da determinação da concentração de raminose, retiradas a cada 24 horas de cultivo.

#### **Tensão superficial**

A tensão superficial foi determinada segundo metodologia Du Nouy desenvolvida originalmente por Dr. Pierre Lacmte (COOPER & ZAJIC, 1979). Foi utilizado o tensiômetro - marca CSC-DUNOY 70.545 – que determina a tensão superficial através do anel de platina submerso em 10mL de amostra sem células.

#### **Crescimento Celular**

A quantificação da biomassa foi obtida por gravimetria, após centrifugação de 5 mL de cada amostra a 10.000 rpm durante 5 minutos, seguida de lavagem e secagem a 80°C durante 24 horas.



## **Determinação do pH**

Durante os cultivos 10 mL de amostra foram centrifugados (10.000 rpm/ 5 minutos) e o sobrenadante foi utilizado para medir o pH em potenciômetro marca Metrohm Herisau.

## **Quantificação de Raminolipídeo**

Foi utilizada a metodologia descrita por DUBOIS (1956). Um volume de 2,0 mL de amostra sem células foi adicionado a 50 µL de fenol e 5 mL de ácido sulfúrico, seguido da leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda de 480nm. A concentração foi determinada utilizando a curva padrão de raminose (Anexo 1).

## **4.5 Caracterização de Raminose**

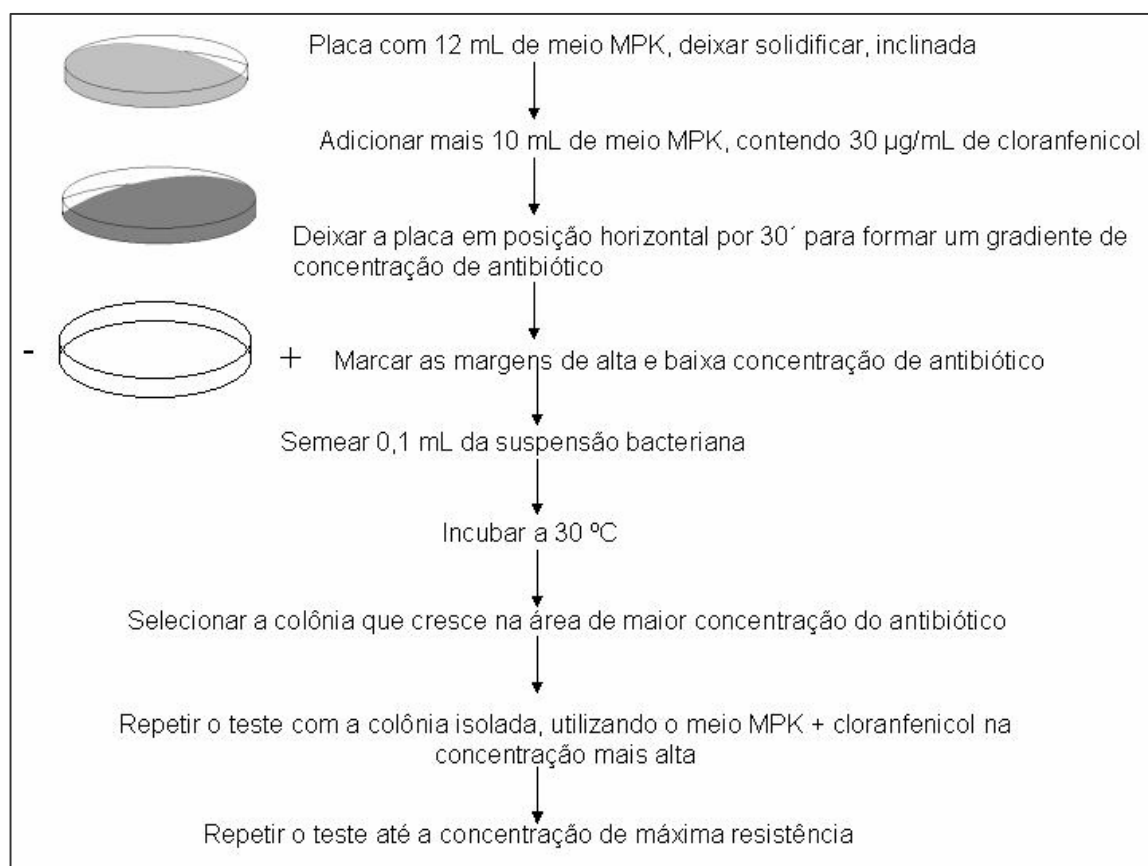
Um volume de 10 mL de amostra sem células foi precipitado pela adição de 0,8g de sulfato de alumínio seguido de agitação por uma hora, segundo a metodologia de Schenk *et al.*, (1995). O precipitado recuperado por centrifugação, foi ressuspensão em água destilada e acidificado com HCl 1M até pH 2,0. Este extrato aquoso, foi tratado com acetato de etila, agitado lentamente e a fase orgânica foi separada e concentrada em rota evaporador, seguida da cromatografia em camada delgada.

### **4.5.1 Cromatografia em Camada Delgada**

O extrato concentrado e o padrão de raminose, foram submetidos a cromatografia em camada delgada, aplicando-se 10 µL há placa de celulose (Merck) e realizada a corrida cromatográfica, com o sistema: clorofórmio: metanol: ácido acético (65:15:2). Após a corrida, a placa foi borrifada com solução de Timol (0,5g de Timol em etanol: ácido sulfúrico concentrado - 95:5) e revelada por aquecimento a 120°C / 20 minutos, seguindo-se a medição do  $R_f$ .

#### 4.6 Seleção de bactérias resistentes ao cloranfenicol

Para a obtenção de mutantes resistentes ao cloranfenicol foi utilizada a técnica de gradiente em placa proposta por Szybalski (1952), utilizando-se cloranfenicol em concentrações de 30 a 220 µg/mL (Figura 4.1).



**Figura 4.1** - Esquema do teste de gradiente em placa

#### 4.7 Identificação das Culturas

A confirmação da espécie *P. aeruginosa* foi realizada utilizando os meios Caldo Asparagina e Caldo Acetamida cujas composições estão no item 4.2.1.

Em meio Caldo Asparagina, após 24 horas de cultivo, ocorre a liberação do pigmento fluorescente esverdeado, evidenciado através da luz ultravioleta. No meio Caldo Acetamida, ocorre a mudança de cor evidenciada através do indicador vermelho de fenol que muda a coloração de amarelo para vermelho brique em pH alcalino.

#### **4.8 Identificação de Pigmentos em *Pseudomonas aeruginosa***

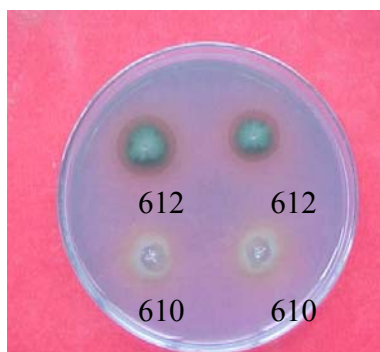
Para verificar se as linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* produzem os pigmentos fluoresceína e piocianina, cada linhagem foi inoculada nos meios MPA-FI, MPA-Pio, além do meio MPK-agar (itens 4.2.1) como controle.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Ensaio Primário

Para verificar a estabilidade das linhagens (UFPEDA-569, 571, 572, 612, 613 e 614) caracterizadas como produtoras de raminolipídeo (DUARTE, 2003), foram repetidos os testes de caracterização do biossurfactante raminolipídico, através da formação de halos azuis (item 4.3). O diâmetro dos halos azuis variam de 9 a 12 mm (Figura 5.1), indicando a mesma atividade observada por DUARTE (2003).

Vários autores (HABA *et al.*, 2000, SANTA ANNA *et al.*, 2002, RAHMAN *et al.*, 2002) relatam a eficiência deste ensaio para caracterização de biossurfactantes raminolipídico em bactérias Gram-negativas, uma vez que, em Agar Sangue a atividade hemolítica destas bactérias, indicativo da ocorrência de biossurfactante em bactéria Gram – positiva, seria mascarada pela produção de  $\beta$ -hemolisina nas bactérias Gram-negativas como destacado por Siegmund & Wagner (1991).

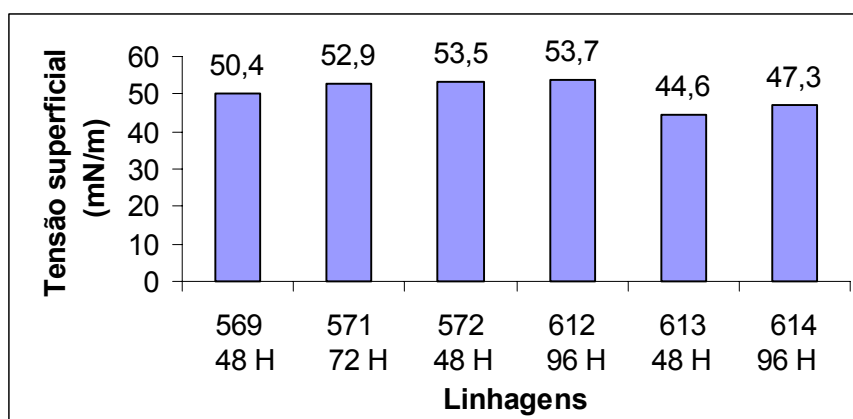


**Figura 5.1-** Formação de halos azuis pelas linhagens UFPEDA-610 e UFPEDA-612.

## 5.2 Ensaio Secundário - Produção de raminolipídeo em meio líquido

As seis linhagens caracterizadas como produtoras de raminolipídeos em meio sólido (UFPEDA - 569; UFPEDA - 571; UFPEDA - 572; UFPEDA - 612; UFPEDA - 613 e UFPEDA - 614) foram investigadas quanto a produção destes biossurfactantes em meios líquidos contendo glicerol (2%) e/ou petróleo bruto (5%) como fontes de carbono.

Os resultados mostram que a tensão superficial final variou de 53,7 mN/m a 44,6 mN/m no meio MLR mais glicerol, num período de 96 horas onde pode ser observado que cada linhagem apresentou a menor tensão superficial em tempos diferentes (Figura 5.2). As mesmas linhagens apresentaram tensão superficial final variando de 28,3 mN/m a 40 mN/m (Tabela 5.1) quando foram cultivadas em meio MRL tendo como fonte de carbono glicose (GOUVEIA *et al.*, 2003) indicando a importância da fonte de carbono para a produção do raminolipídeo. Para estas linhagens glicose é melhor que glicerol para produção do raminolipídeo. Entretanto, em meio MG com glicerol, a tensão superficial baixou até 28 mN/m. Portanto, não se pode afirmar que glicose é melhor.



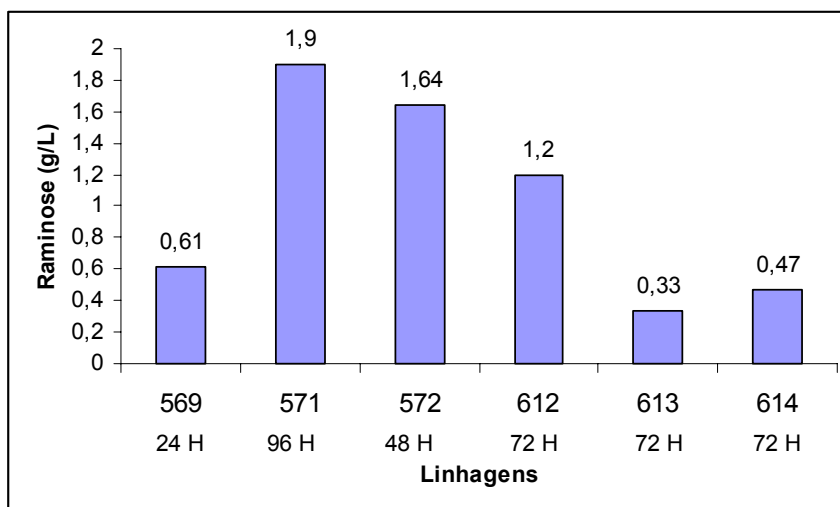
**Figura 5.2-** Tensão superficial das seis linhagens em meio MLR mais glicerol, cultivadas sob agitação durante 96 horas.

**Tabela 5.1-** Comparação da Tensão superficial final das linhagens cultivadas por 96 horas nos meios MLR + glicerol e MLR + glicose

<b>Linhagens N° (UFPEDA)</b>	<b>Meio MLR + Glicerol Tensão superficial final (mN/m)</b>	<b>Meio MLR + Glicose * Tensão superficial final (mN/m)</b>
569	50,4	41,0
571	52,9	29,8
572	53,5	30,0
612	53,7	34,05
613	44,6	30,0
614	47,3	28,3

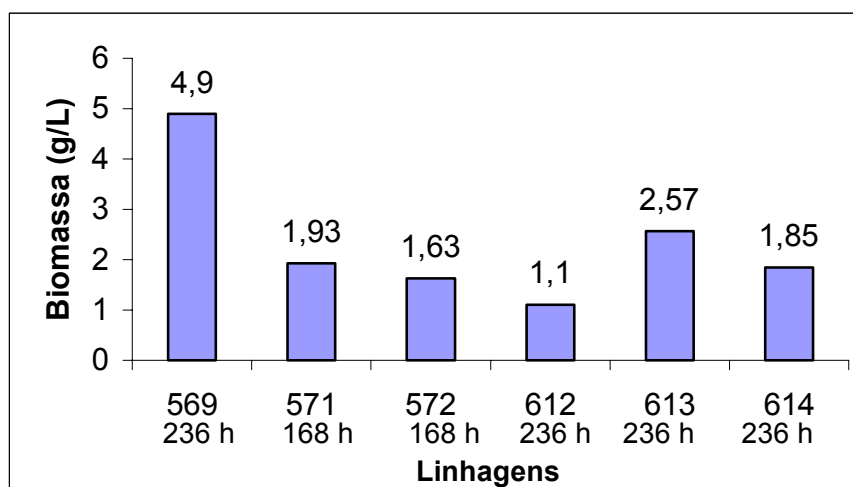
\* Resultados segundo Gouveia *et al.*, (2003)

A concentração de raminose, variou de 0,33 g/L para a linhagem UFPEDA-613 a 1,9 g/L para a linhagem UFPEDA-571 (Figura 5.3). A menor tensão superficial final não corresponde com a maior concentração de raminose, uma vez que altas concentrações de raminose foram observadas para as linhagens UFPEDA-571, 572 e 612 (Figura 5.3).



**Figura 5.3-** Concentração de raminose das seis linhagens cultivadas em meio MLR mais glicerol.

Quanto à biomassa (Figura 5.4), maior concentração foi observada para as linhagens UFPEDA-569 e 613, respectivamente 4,9 g/L e 2,57 g/L, as quais apresentaram as menores concentrações de raminose respectivamente 0,61 g/L e 0,33 g/L (Figura 5.3) indicando que a produção de raminolipídeo não foi associada ao crescimento celular. Houve alteração significativa do pH na fermentação com o meio MLR mais glicerol variando de 6,6 a 4,6.



**Figura 5.4-** Biomassa obtida durante a fermentação em meio MLR mais glicerol como fonte de carbono.

Gouveia *et al.*, (2003) também observaram comportamento igual para as mesmas linhagens quando cultivadas em meio MG mais glicerol.

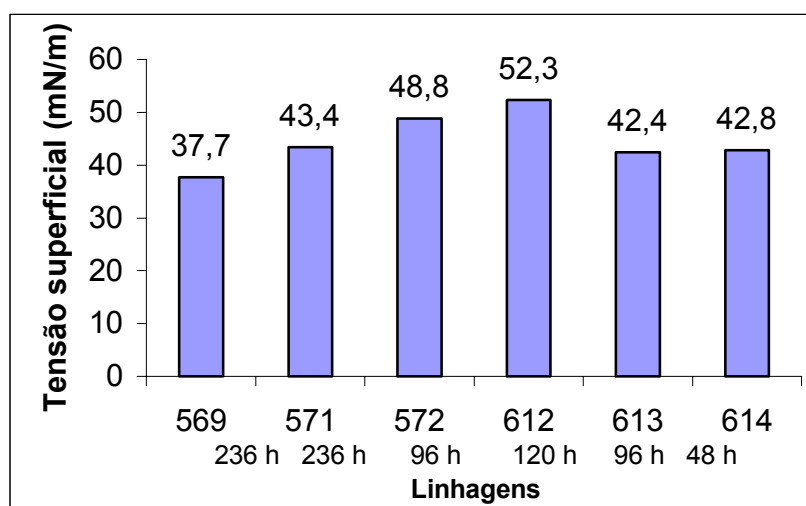
Rahman *et al.*, (2002) encontraram concentração de biomassa maior que 5 g/L apenas quando glicerol foi adicionado após a fase exponencial de crescimento durante cultivo com *P. aeruginosa* em meio contendo glicose como fonte de carbono.

A produção de raminolípídeos na fase estacionária também foi observada por outros autores (RON & ROSEMBERG, 2002; SANTA ANNA *et al.*, 2002; RAHMAN *et al.*, 2002).

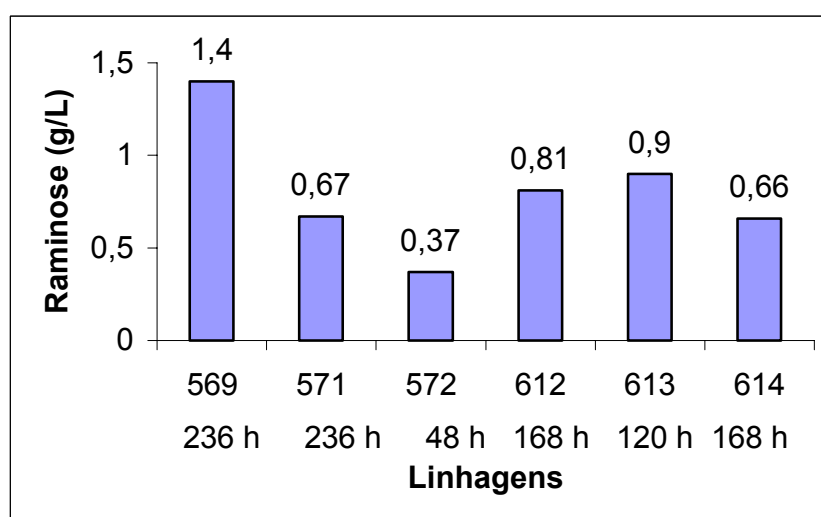
Quando se utilizou petróleo como fonte de carbono, os resultados observados na figura 5.5 mostram que a tensão superficial final variou de 37,7 mN/m a 52,3 mN/m mostrando que utilizando petróleo como fonte de carbono as linhagens apresentaram menor tensão superficial que o observado no ensaio anterior utilizando glicerol como fonte de carbono. Esta menor tensão superficial 37,7mN/m ocorreu após 236 horas de cultivo para a linhagem UFPEDA-569, enquanto que no meio MLR mais glicerol a menor tensão superficial final desta linhagem foi 50,4 mN/m com 48 horas de cultivo (Figura 5.2). Além do mais, a concentração de raminose 1,4 g/L (Figura 5.6) foi a mais



alta entre as linhagens testadas, indicando que o petróleo como fonte de carbono é melhor que o glicerol para esta linhagem. Houve alteração significativa do pH na fermentação com o meio MLR mais petróleo bruto variando de 7,0 a 4,6.



**Figura 5.5-** Tensão superficial das seis linhagens em meio MLR mais petróleo bruto cultivadas sob agitação durante 236 horas.



**Figura 5.6-** Concentração de raminose (g/L) das seis linhagens cultivadas no meio MLR mais petróleo bruto, durante 236 horas de fermentação.

A concentração de raminose neste meio MLR mais petróleo variou de 0,37 g/L (UFPEDA-572) a 1,4 g/L (UFPEDA-569) em diferentes tempos de fermentação.

Santa Anna *et al.*, (2000) utilizando *P. aeruginosa* PA1, isolada de ambientes de petróleo, e o mesmo meio de cultura, obtiveram 0,76 g/L de raminose após 7 dias de fermentação.

De modo geral maiores produções são geralmente obtidas em cultivos em batelada alimentada. Rahman *et al.*, (2002), obtiveram maior produção quando utilizou óleo de soja ou glicerol, em cultivos com *P. aeruginosa* DS10-129, após 46, 144 e 192 horas de fermentação em batelada alimentada.

### 5.3 Seleção de Bactérias Resistentes ao Cloranfenicol

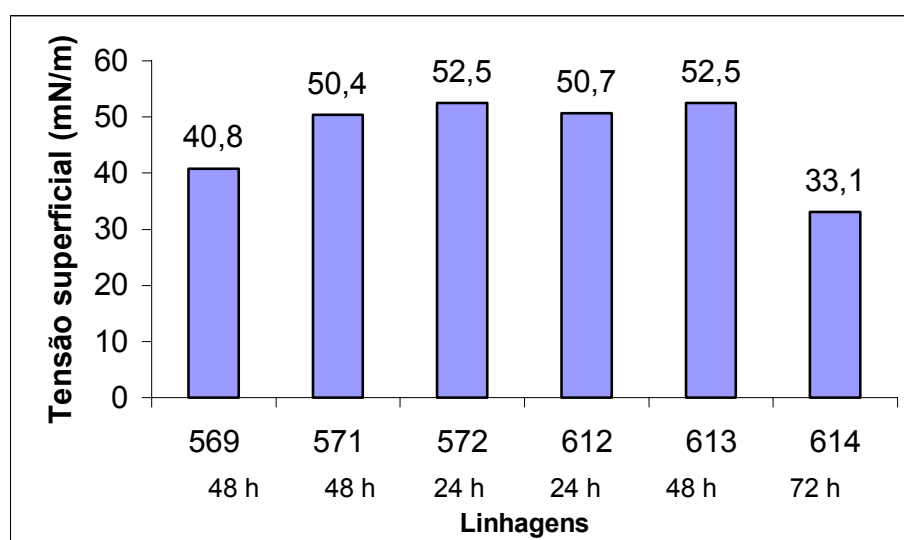
Durante este ensaio foram testadas concentrações de 30 µg/mL a 300 µg/mL de cloranfenicol. A linhagem UFPEDA-614 apresentou maior resistência ao cloranfenicol em relação as demais linhagens, com concentração de 220 µg/mL. A menor resistência foi observada para a linhagem UFPEDA-572 com concentração de 190 µg/mL (Tabela 5.2).

**Tabela 5.2** – Linhagens resistentes a diferentes concentrações de cloranfenicol.

Nº da UFPEDA	Concentração de Cloranfenicol (µg/mL)
569	200
571	200
572	190
612	200
613	200
614	220

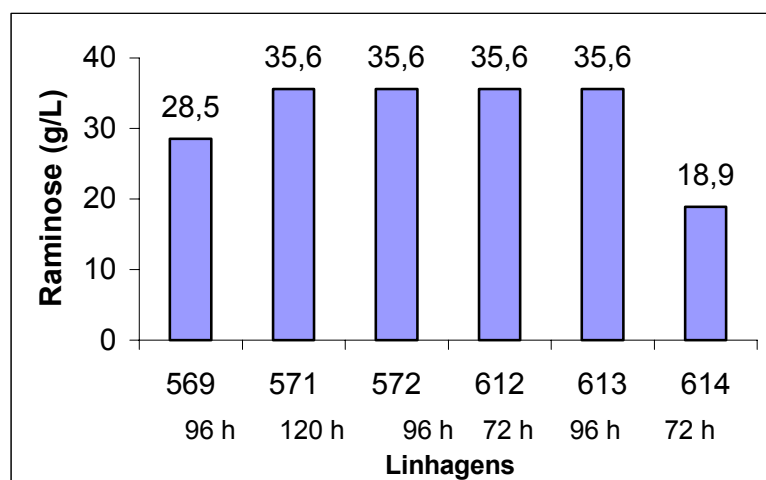
As linhagens resistentes às diferentes concentrações de cloranfenicol foram submetidas a cultivos em meio MLR + glicerol com cloranfenicol. Os resultados

apresentados na Figura 5.7 mostram que as menores tensões superficiais 40,8 mN/m e 33,1 mN/m foram observadas para as linhagens UFPEDA-569 e 614 respectivamente, após 48 e 72 horas de cultivo. Estes resultados comparados com àqueles obtidos com a linhagem parental (Figura 5.2) mostram que a tensão superficial diminuiu para as linhagens resistentes ao cloranfenicol indicando que estes mutantes resistentes são altos produtores de raminolípídeo como foi observado por Mulligan, (1989) para *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a 150 µg/mL de cloranfenicol.



**Figura 5.7-** Tensão superficial das seis linhagens resistentes ao cloranfenicol em meio MLR mais glicerol, cultivadas sob agitação durante 120 horas.

Este melhoramento das linhagens foi confirmado através da quantificação de raminose, onde foram observados concentrações de 18,9 g/L para UFPEDA-614 e 28,5 g/L para UFPEDA-569. As linhagens UFPEDA- 572, 612 e 613 alcançaram uma concentração de 35,66 g/L entre 24 e 96 horas de fermentação (Figura 5.8). Houve alteração significativa do pH no cultivo com o meio MLR mais glicerol com cloranfenicol variando de 6,7 a 4,6.



**Figura 5.8-** Concentração de raminose das seis linhagens resistentes ao cloranfenicol em meio MLR mais glicerol, cultivadas sob agitação durante 120 horas.

A linhagem parental (UFPEDA-614) produziu com 48 horas apenas 0,47 g/L de raminolipídeo, ocorrendo um aumento de 38% para a linhagem resistente ao cloranfenicol. As linhagens parentais (UFPEDA-572, 612 e 613), que produziram respectivamente, 1,64 g/L; 1,2 g/L e 0,33 g/L de raminolipídeo; o aumento variou de 22 a 108 vezes mais (Tabela 5.3). Estes resultados são superiores àqueles observados por Mulligan, (1989) para *P. aeruginosa*, cujo aumento observado foi de 10 vezes para um mutante resistente ao cloranfenicol

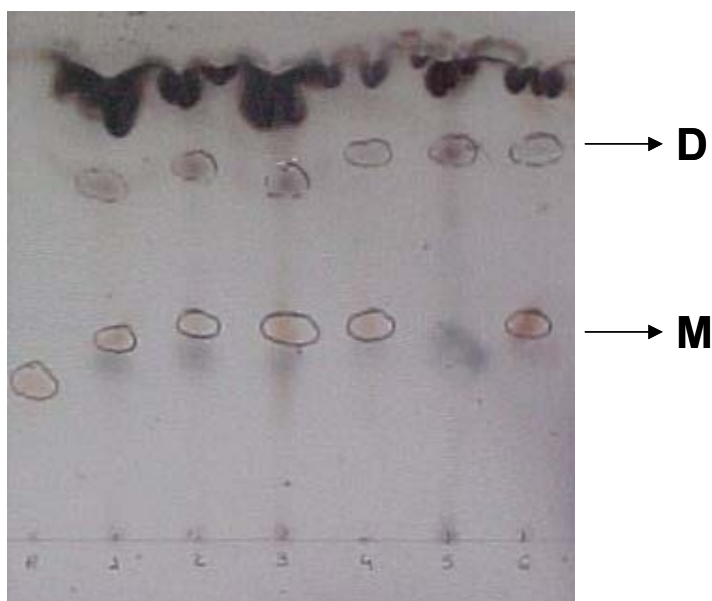
**Tabela 5.3-** Aumento (número de vezes) da concentração de raminose das linhagens parentais e dos mutantes resistentes no meio de fermentação MLR mais glicerol

<b>Linhagens</b> <b>N° UFPEDA</b>	<b>Parental</b> <b>Raminose (g/L)</b>	<b>Mutantes Resistentes</b> <b>Raminose (g/L)</b>	<b>Aumento</b> <b>(N° de vezes)</b>
569	0,61	28,5	47
571	1,9	35,6	19
572	1,64	35,6	22
612	1,2	35,6	29
613	0,33	35,6	108
614	0,47	18,9	40

#### 5.4 Caracterização dos Raminolípidos

Através da cromatografia em camada delgada foi possível separar os componentes mono e di-raminosil de acordo com a mobilidade do açúcar (item 4.5). A fração menos móvel, corresponde ao fragmento di-raminosil, enquanto a de menor peso molecular que apresenta maior mobilidade corresponde ao mono-raminosil. A produção de diferentes tipos de raminolípidos pelas linhagens, foi observada por Wu & Ju, (1998), mostrando que o biossurfactante produzido por *Pseudomonas* consiste de pelo menos dois tipos principais de raminolípidos, o mono-raminolípido (L-raminosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato) - RL-1 e o di-raminolípido (L-raminosil-l-raminosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato) - RL-2.

A Figura 5.9 apresenta a presença de mono-raminose e di-raminose através da cromatografia em camada delgada com  $R_f$  de 0,74 e 0,36, respectivamente. As linhagens UFPEDA-569, 571, 572 e 613 produzem biossurfactante raminolípido com duas raminoses (di-raminolípido) enquanto que, as linhagens UFPEDA-612 e 614 produzem raminolípido com apenas uma raminose (mono-raminolípido).



**Figura 5.9-** Separação de Mono-raminose (M) e Di-raminose (D) por cromatografia em camada delgada (TLC) das linhagens (1): UFPEDA – 569, (2): UFPEDA-571, (3): UFPEDA-572, (4): UFPEDA-612, (5): UFPEDA-613 e (6): UFPEDA-614.

Benincasa *et al.*, (2004) observaram que o biossurfactante di-raminolipídeo (RL-2) é um dos produtos mais abundantes na cultura de *P. aeruginosa* LBI. Nesse contexto, Déziel *et al.*, (2000) analisaram a composição relativa do raminolipídeo durante diversos intervalos de tempo da linhagem 57RP de *P. aeruginosa* e nenhuma mudança significativa foi observada.

### 5.5 Identificação de *Pseudomonas aeruginosa*

Das seis linhagens oxidase positiva analisadas pelo Kit Bac-Tray III (LIMA, 2003) todas foram confirmadas como pertencentes a espécie *P. aeruginosa*, entretanto, com grau de segurança em torno de 60%, sendo necessário recorrer a outros testes bioquímicos para sua identificação.

Das seis linhagens oxidase positiva, todas foram inoculadas em Caldo Asparagina, observando-se o crescimento turvo e produção de pigmento fluorescente esverdeado evidenciado através de luz ultravioleta, sendo este resultado indicativo que as linhagens são *Pseudomonas*. No ensaio confirmativo para *P. aeruginosa* no meio Caldo Acetamida, as linhagens responderam positivamente, através da alcalinização do meio mostrada pela alteração de cor de amarela para púrpura (figura 5.10) indicando que as linhagens pertencem a espécie *P. aeruginosa*.

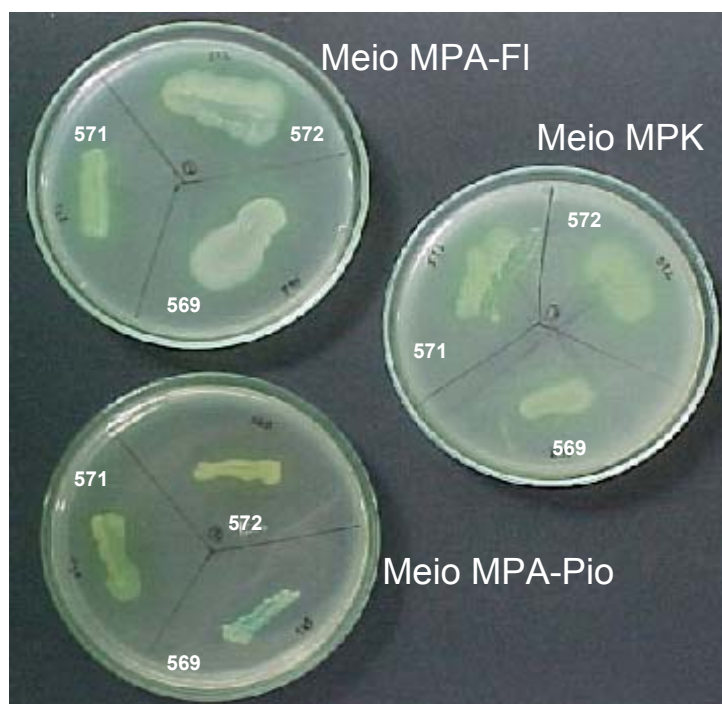


**Figura 5.10-** Ilustração da linhagem UFPEDA-614 no meio Caldo Asparagina e no meio Caldo Acetamida.

### 5.6 Identificação de Pigmentos por *Pseudomonas aeruginosa*

No meio MPA-FI ocorre a formação de colônias amarelo esverdeado difundidas no Agar com zonas fluorescentes, observadas com luz UV, e no meio MPA-Pio ocorre a produção do pigmento azul difundido no Agar, indicando a produção de piocianina.

Das seis linhagens, quatro (66,6%) linhagens (UFPEDA-571, 572, 612, 613) produziram os dois pigmentos (fluoresceína e piocianina) e as outras duas (33, 4%) linhagens (UFPEDA-569 e 614) produziram o pigmento fluoresceína. A Figura 5.11 apresenta a produção dos pigmentos fluoresceína e piocianina.



**Figura 5.11-** Pigmentos fluoresceína e piocianina produzidos pelas linhagens UFPEDA-569, 571 e 572.



## 6. CONCLUSÕES

- As linhagens UFPEDA-571 e 572 se destacaram como as maiores produtoras de raminolípido produzindo respectivamente 1,9 g/L e 1,64 g/L em meio MLR mais glicerol, não sendo observado diminuição da tensão superficial.
- No meio MLR mais petróleo a melhor linhagem foi UFPEDA-569 que produziu 1,4 g/L de raminolípido e apresentou tensão superficial 37,7 mN/m.
- Pode-se concluir que nas condições estudadas a produção de raminolípido não está associada ao crescimento, uma vez que sua concentração máxima só foi obtida durante a fase estacionária de crescimento, típico de metabólito secundário.
- As linhagens estudadas foram resistentes a diferentes concentrações de cloranfenicol. A linhagem UFPEDA- 572 resistente a 190 µg/mL, as linhagens UFPEDA-569, 571, 612 e 613 resistentes a 200 µg/mL, e a linhagem UFPEDA-614 resistente a 220 µg/mL.
- As linhagens UFPEDA-572, 612 e 613 resistentes ao cloranfenicol se destacaram como as maiores produtoras de raminolípido no meio MLR mais glicerol com produção de 35,6 g/L.
- As linhagens UFPEDA-569, 571, 572 e 613 produziram biossurfactante di-raminolípido e as linhagens UFPEDA-612 e 614 produziram biossurfactante mono-raminolípido.
- Das seis linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, quatro (UFPEDA-571, 572, 612, 613) produzem dois pigmentos (fluoresceína e piocianina) e duas (UFPEDA-569 e 614) produzem somente fluoresceína.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AKIT, J.; COOPER, D .J.; MANNINEN, K. I.; ZAJIC, J. E. Investigation of potencial biosurfactant production among phytopathogenic *Corynebacteria* and reladet soil microbes. **Current Microbiology**, v.6, p.145-150, 1981.

ANZAI, Y.; KIM, H.; PARK, J.Y.; WAKABAYASHI, H.; OYAIZU, H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. **International Journal Systematic Evoluation Microbiology**, v. 4, p. 1563-1589, 2000.

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

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

ATLAS, R.M.; BARTHA, A.K. Hydrocarbon biodegradation and oil-bioremediation. **Advances Microbiology Ecology** , v. 12, p. 287-338, 1992.

BANAT, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 1-12, 1995.

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

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potencial commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BENGMARK, S. Immunonutrition: role of biosurfactants, fiber and probiotic bacteria. **Nutrition**, v. 14, p. 585-594, 1998.

BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 85, p. 1-8, 2004.

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

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

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids Surface A: Physicochemistry Engeneering Aspects** , v. 152, p. 41-52, 1999.

BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W.; GARRITY, G.M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Second edition, Springer, 2002.

BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A.; JAWETZ, MELNICK, & ADELBERG. Microbiologia Médica, 210 edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 611, 2000.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 50, p. 520-529, 1998.

CHEN, C. H.; LU, J. J.; LIU, Y. T.; LEE, J. H.; LEE, W. H., LEE, C. H. Comparison of three typing methods for *Pseudomonas aeruginosa*, **Zhonghua mim guo wei sheng wu ji mian yi xue za**, v. 29, p. 90-99, 1996.

CLARK G.B.; KLINE B. Impact of oil shortage on plastic medical supplies. **Publi Health Rep.**, v. 96, p. 111-115, 1981.

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

COOPER, D.G.; PADDOCK, D.A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bambicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, p. 173-176, 1979.

COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface active agents from *Bacillus* species. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, p. 224-229, 1987.

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

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

DESAI, J.D.; DESAI, A.J. Production of biosurfactants, p. 65-97. *In* Kosaric, N. (ed.), Biosurfactants: production, properties, applications. **Marcel Dekker**, Inc., New York, N.Y., 1993.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.

DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; VILLEMUR, R. Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1485, p. 145-152, 2000.

DUARTE, M.S. Caracterização de Bactérias Isoladas de Poços de Petróleo Produtoras de Rhamnolípidios. **Dissertação de conclusão do Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos**, Recife, 2003.

DUBOIS, M., K. A. GILLES.; J. K. HAMILTON.; P..A. REBERS.; F. SMITH. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Chemistry**, v.28, p. 350-356, 1956.

EDWARDS JUNIOR, R.; HAYASHI, J.A. Structure of a rhamnolipid from *Pseudomona aeruginosa* . **Archieves of Biochemistry Biophysics**, v.111, p.415 – 421, 1965.

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

FLASZ, A.; ROCHA, C.A.; MOSQUERA, B.; SAJO, C. Comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. **Medical Science Research**, v. 26, p. 181-185, 1998.

FREITAS, A. L. & BARTH, A. L. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* from hospitalized patients: a comparison of susceptibility and biochemical profiles with genotype, **Brazilian Journal of Medical Biology Research.**, v. 37, p. 77-82, 2004.

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

GUERRA-SANTOS, L.H.; KAPPEL, O.; FIETCHER, A. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 443-448, 1986.

GÖBBERT, U.; LANG, S.; WAGNER, F. Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*. **Biotechnology Letters**, v.6, p. 225-230, 1984.

GOUVEIA, E.R.; LIMA, D.P.A.; DUARTE, M.S.; LIMA, G.M.S.; ARAUJO, J.M. Produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de poços de petróleo. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Ed. nº 30, p. 39-45, 2003.

HABA, E.; ESPUNY, M.J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 379-387, 2000.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HOROWITZ, S.; GILBERT, J.M.; GRIFFIN, W.M. Isolation and characterization of a surfactant production by *Bacillus licheniformes*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.6, p.246-248, 1990.

IQBAL, S.; KHALID, Z.M.; MALLK, K.A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, p. 176-179, 1995.

ITO, S.; INOUE, S. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*: possible relation in alkane uptake. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p. 1278-1283, 1982.

JARVEIS, F.G.; JOHNSON, N.J. A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of American Chemistry Society**, v. 61, p. 4124, 1949.

KANTIN, R. Poluição aquática por detergentes: aspectos gerais. Rio de Janeiro: **Engenharia Sanitária**, v. 19, p. 82-85, 1980.

KIKUCHI, T.; HASUMI, K. Enhancement of plasminogen activation by surfactin C: augmentation of fibrinolysis *in vitro* and *in vivo*. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1596, p. 234-245, 2002.

KING, E.O.; WARD, M.K.; RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal Laboratory Clinical Medical**, v. 44, p. 301, 1954.

KITAMOTO, D.; YANAGISHITA, H.; SHINBO, T.; NAKANE, T.; KAMISAWA, C.; NAKAHARA, T. Surface active properties antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. **Journal Biotechnology**, v. 29, p. 91-96, 1993.

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

KRESTCHMER, A.; BOCK, H.; WAGNER, F. chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on *n*-alkanes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, p. 864-870, 1982.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnolipids – biosynthesis, microbial production and application potential. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.51, p. 22-32, 1999.

LANG, S.; WAGNER, F. Structure and properties of biosurfactants, p. 21-47. *In* Kosaric, N., W. L. Cairns, and N. C. C. Gray (ed), Biosurfactants and biotechnology. **Marcel Dekker**, Inc., New York, N.Y., 1987.

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

LI, Z.; LANG, S.; WAGNER, F.; WITTE, L.; WRAY, V. Formation and identification of interfacial-active glycolipids from resting microbial cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 610-617, 1984.

LIMA, D.P.A . Identificação e caracterização de bactérias produtoras de ramnolipídeo, utilizando diferentes fontes de carbono. **Monografia de conclusão do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2003.**

LIN, S.C. Biosurfactants: recent advances. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**, v. 63, p. 109-120, 1996.

LIN, S.C.; SHARMA, M.M.; GEORGIU, G. Production and deactivation of biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF - 2. **Biotechnology Program**, v. 9, p. 138-145, 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. **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 49, p. 3296-3303, 2001.

MICHEL-BRIAND, Y., BAYSSE, C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*, **Biochemie**, n. 84, p. 499-510, 2002.

MITTENBUHLER, K.; LOLEIT, M.; BAIER, W.; FISCHER, B.; SELDEMEIER, E.; JUNG, G.; WINKELMANN, G.; JACOB, C.; WECKESSER, J.; ERHARD, M.H.; HOFMANN, A.; BESSLER, W.; HOFMANN, P. Drug specific antibodies: T-cell epitope-lipopeptide conjugates are potent adjuvants for small antigens *in vivo* and *in vitro*. **International Journal Immunopharmacology**, v. 19, p. 277-287, 1997.

MULLIGAN, C.N. Biosurfactant production by a chloramphenicol tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 37-44, 1989.

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

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Factors influencing the economics of biosurfactants. In: KOSARIC, N. (Ed.), Biosurfactants, Production, Properties, Applications. **Marcel Dekker**, New York, pp. 329-371, 1993.

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.

NAKANISHI, M. New strategy in gene transfection by cationic transfection lipids with cationic cholesterol. **Current Medical Chemistry**, v. 10, p. 1289-1296, 2003.

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

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

OSCHSNER, U.A.; FIECHER A; REISER J. Isolation characterization and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipids biosurfactant synthesis. **Journal of Biotechnology Chemistry**, v 269, p. 19787-19795, 1994.

PALEJWALA, S.; DESAI, J.D. Production of extracellular emulsifier by a Gram negative bacterium. **Biotechnology**, v. 11, p. 115-118, 1989.

PARRET, A. H. A., DE MOT, R. Bacteria killing their own kind: novel bacteriocins of *Pseudomonas* and other  $\gamma$ -proteobacteria, **Trends in Microbiology**, v. 10, p. 107-112, 2002.

RAHMAN, K.S.; RAHMAN, T.J.; MARCHANT, R.; BANAT, L.M. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low - cost raw materials. **Biotechnology Program**, v. 18, p. 1277-1281, 2002.

RAMALHO, R.; CUNHA, J.; TEIXEIRA, P., GIBBS, P. A. Modified *Pseudomonas* Ágar: new differential medium for the detection/enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water, **Journal of Microbial Methods**, v. 49, p. 69-74, 2002.

REYES, E. A. P.; BALE, M. J.; CANNON, W. H., MATSEN, J. M. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by pyocinin production on Tech Ágar, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 13, p. 456-458, 1981.

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

RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 249-252, 2002.

SANDRIN, C.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Coproduction surfactin and inturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal proprieties, by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v 12, p. 370-375, 1990.

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

SANTA ANNA, L.M.; SEBASTIAN, G.V.; MENEZES, E.P.; FREIRE, D.M.G. Production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA 1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, p. 159-166, 2002.

SCHENK, T.; SCHUPHAN, I.; SCHMIDT, B. High-perfomance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Chromatography A**, v. 693, p. 7-13 1995.

SHEPHORD, R.; ROCKEY, J.; SHUTHERLAND, I.W.; ROLLER, S. Novel bioemulsifier from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**, n. 40, p. 316-320, 1995.

SIEGMUND, I.; WAGNER, F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. **Biotechnology Techniques**, v. 5, p. 265-268, 1991.

SIM, L.; WARD, O.P.; LI, Z.Y. Production and characterisation of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 232-238, 1997.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S.S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends in Biotechnology**, v. 22, p. 142-146, 2004.

SZYSBALLSHI, W. M Microbial selection gradient plate technique for study of bacterial resistance. **Science**, v. 116, p. 46-48, 1952.

SYLDATK, C.; LANG, S.; WAGNER, F.; WRAY, V.; WITTE, L. Chemical and physical characterization of four interfacial active rhamnolipids from *Pseudomonas* species. DSM 2874 grown on n-alkane. **Z Naturforsch**, v. 40, p. 51-60, 1985.

TAHZIBI, A.; KAMAL, F.; ASSADI, M.M. Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. **Iranian Biomedical Journal**, v.8, p. 25-31, 2004.

THIMON, L.; PEYUX, F.; MAGET-DANA, R.; ROUX, B.; MICHEL G. Interactions of bioactive lipopeptides, inturin A and surfactin from *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v.16, p. 144-151, 1992.

TREDGET, E. E.; SHANKOWSKY, H. A.; RENNIE, R.; BURRELL, R. E., LOGSETTY, S. *Pseudomonas* infections in thermally injured patient, **Burns**, v. 30, p. 3-26, 2004.

TSORAEVA, A., MARTÍNEZ Comparison of two culture media for selective isolation and membrane filter enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in water, **Revista Latinoamericana de Microbiología**, n. 42, p. 149-154, 2000.

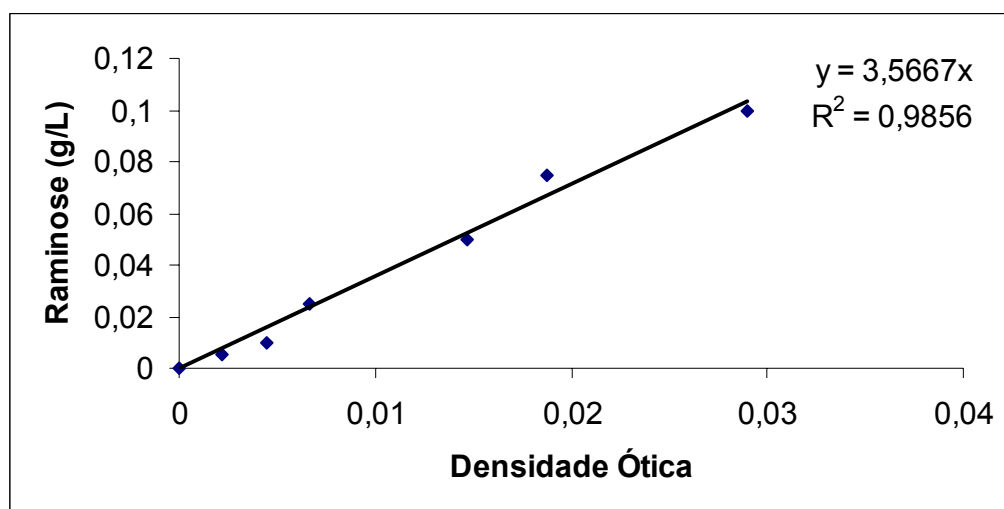
YAMANE, T. Enzyme technology for the lipid industry: an engineering overview. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 64, p. 1657-1662, 1987.

WILLUMSEM, P.A. & KARLSON, V. Screening of bacteria isolated from PAH-contaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v. 7, p. 415-423, 1997.

WU, J.; JU, L. K. Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, v. 59, p. 193-202, 1998.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Curva padrão de raminose



**8.2 Tabela 6 – Análise dos parâmetros físico-químicos e biológicos das linhagens estudadas na fermentação com o meio MLR mais glicerol**

<b>Linhagens UFPEDA</b>	<b>Tempo (Horas)</b>	<b>Tensão superficial mN/m</b>	<b>Raminose (g/L)</b>	<b>Biomassa (g/L)</b>
569	0	55,6	0,34	0,3
	24	56	0,61	0,85
	48	50,4	0,52	1,15
	72	52,2	0,36	1,5
	96	50,9	0,52	1,9
571	0	55,3	1	0,15
	24	57,3	1,44	1,35
	48	54,5	1,74	1,8
	72	52,9	1,04	1,4
	96	54,5	1,9	0,85
572	0	58,3	0,95	0,4
	24	58	0,92	1,25
	48	53,5	1,64	1,3
	72	57,5	1,27	1,2
	96	55,8	0,94	1,7
612	0	60,9	0,42	0,15
	24	54,9	0,37	0,55
	48	54,1	0,93	1
	72	56,5	1,2	1,05
	96	53,7	0,87	1,35
613	0	50,8	0,21	0,6
	24	50,3	0,15	1,8
	48	44,6	0,24	1,3
	72	47	0,33	1,6
	96	47,8	0,31	1,6
614	0	50,4	0,18	0,3
	24	61,3	0,31	1,4
	48	59,6	0,35	1,7
	72	55	0,47	1,4
	96	53,5	0,38	2

**8.3 Tabela 8– Análise dos parâmetros físico-químicos e biológicos das linhagens estudadas na fermentação com o meio MLR mais petróleo bruto.**

<b>Linhagens UFPEDA</b>	<b>Tempo (Horas)</b>	<b>Tensão superficial mN/m</b>	<b>Raminose (g/L)</b>	<b>Biomassa (g/L)</b>
569	0	63,6	0,32	0,1
	48	62,4	0,29	0,07
	96	51,4	0,32	1,1
	120	53,3	0,29	,2
	168	41,1	0,63	0,93
	236	37,7	1,4	4,9
571	0	62,9	0,72	0,23
	48	47,2	0,3	0,77
	96	44,4	0,27	1,8
	120	45,7	0,44	2,1
	168	49,6	0,32	1,93
	236	43,4	0,67	1,77
572	0	57,8	0,26	0,5
	48	54,3	0,37	1,63
	96	48,8	0,23	1,63
	120	55,9	0,34	1,27
	168	59,4	0,25	1,63
	236	60,5	0,35	1,63
612	0	50,4	0,52	0,13
	48	57,7	0,51	0,33
	96	61,2	0,56	0,27
	120	52,3	0,41	0,8
	168	54,2	0,81	0,5
	236	54,6	0,48	1,1
613	0	70,6	0,68	0,37
	48	72,9	0,79	0,23
	96	42,4	0,5	1,23
	120	48	0,9	1,27
	168	64,3	0,61	2,27
	236	57,3	0,41	2,57



---

614	0	49,9	0,65	0,25
	48	42,8	0,38	1,1
	96	44,3	0,28	1,15
	120	46	0,48	1,4
	168	8,4	0,66	1,55
	236	46,5	0,38	1,85

---

**8.4 Tabela 9– Análise dos parâmetros físico-químicos e biológicos das linhagens estudadas na fermentação com o meio MLR mais glicerol com cloranfenicol.**

<b>Linhagens UFPEDA</b>	<b>Tempo (Horas)</b>	<b>Tensão superficial mN/m</b>	<b>Raminose (g/L)</b>	<b>Biomassa (g/L)</b>
569	0	68	18,9	0,41
	24	60	14,2	0,08
	48	40,8	9,2	0,37
	72	60	7,13	2
	96	56,9	28,5	0,44
	120	62,1	22,4	0,16
571	0	58,5	8,2	0,12
	24	55,2	35,6	0,05
	48	50,4	16,4	0,18
	72	60	24,9	0,19
	96	63,7	25	0,45
	120	59,5	34,6	2,4
572	0	68	14,3	0,23
	24	52,5	25,3	0,23
	48	57,8	33,5	0,29
	72	58,4	35,3	0,32
	96	54,9	35,6	0,37
	120	58	19,6	0,34
612	0	67,4	34,6	0,23
	24	50,7	34,9	0,84
	48	52	28,2	0,36
	72	53,2	35,6	0,28
	96	60,4	33,9	0,53
	120	58,7	32,8	0,42
613	0	67,4	21,4	0,47
	24	65	34,9	0,16
	48	52,5	25,7	3
	72	56	26,3	0,15
	96	66,8	35,6	1,04
	120	62,9	22,1	0,9

614	0	66	10,3	0,11
	24	47,1	12,8	0,27
	48	51,5	19,3	1
	72	33,1	18,9	0,13
	96	59,5	8,5	0,48
	120	56,8	8,4	0,19