

Bactérias Produtoras de Biossurfactantes

Produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de poços de petróleo

Ester Ribeiro Gouveia

Departamento de Antibióticos – UFPE
Doutora em Engenharia Química.
ester.gouveia@bol.com.br

Danielle Patrice Alexandre Lima

Departamento de Antibióticos – UFPE
Bacharel em Ciências Biológicas.
daniellepatrice3@hotmail.com

Maria do Socorro Duarte

Departamento de Antibióticos – UFPE
Mestre em Biotecnologia de Produtos Bioativos
msocorroda@bol.com.br

Gláucia Manoella de Souza Lima

Departamento de Antibióticos – UFPE
Mestre em Biotecnologia de Produtos Bioativos.
gmslima@yahoo.com.br

Janete Magali de Araújo

Departamento de Antibióticos – UFPE
Dr^a Prof^a adjunta da UFPE.
janetemagali@yahoo.com.br

Ilustrações cedidas pelos autores

Resumo

Os biossurfactantes são moléculas produzidas por bactérias, fungos ou leveduras, que apresentam propriedades biológicas aplicáveis a várias indústrias, tais como, a indústria farmacêutica, de cosméticos, de petróleo e de alimentos. Estes compostos, nos últimos anos, têm recebido atenção especial devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e conseqüente aceitabilidade ecológica. Os biossurfactantes são classificados em glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, biossurfactantes poliméricos, fosfolipídeos e ácidos graxos. Dentre os glicolipídeos, os mais estudados são os raminolipídeos, produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*. Este trabalho teve como objetivo a produção de biossurfactantes raminolipídico por bactérias isoladas de poços de petróleo. Inicialmente, 40 bactérias isoladas de poços de petróleo no Canto do Amaro/RN foram isoladas e caracterizadas como produtoras ou não de raminolipídeos, utilizando-se um ensaio primário semiquantitativo. Destas bactérias, 13 deram resultado positivo e foram identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*, com exceção de duas bactérias, que foram identificadas apenas como *Pseudomonas*. Na segunda etapa foram realizados cultivos em frascos agitados com meio de cultura contendo glicose ou glicerol como fontes de carbono. O glicerol foi uma fonte mais apropriada, com produtividade de raminose maior que aquela encontrada na literatura utilizando o mesmo meio e outra linhagem isolada de outro local. Na etapa seguinte, foram realiza-

dos experimentos de degradação de petróleo bruto pelas 13 bactérias. Estes resultados mostraram o potencial destas linhagens em produzir biossurfactantes raminolipídico, utilizando petróleo bruto como fonte de carbono o que apresenta ser de grande importância para a biorremediação de áreas contaminadas por derramamento de petróleo.

1. Introdução

Os surfactantes compreendem uma classe importante de compostos químicos muito utilizados em diversos setores industriais, uma vez que atuam como dispersantes e/ou solubilizantes de compostos orgânicos, apresentando baixa solubilidade em água. A importância comercial dos surfactantes torna-se evidente a partir da tendência do mercado que vem aumentando sua produção em decorrência da diversidade de aplicações industriais.

Os surfactantes possuem estrutura molecular com grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que exibem propriedades como adsorção, formação de micelas, formação de macro e micro emulsões, ação espumante ou antiespumante, solubilidade e detergência. Um dos índices mais utilizados para avaliação desta atividade surfactante é a concentração de micelas críticas (CMC) que é a solubilidade de um surfactante dentro da fase aquosa ou a concentração mínima requerida para atingir a mais baixa tensão superficial ou interfacial (Lin, 1996). A eficiência e a efetividade são características básicas essenciais que determinam um bom surfactante. A eficiência é medida através da CMC que varia de 1 a 2000 mg/l, enquanto que a efetividade está relacionada com as

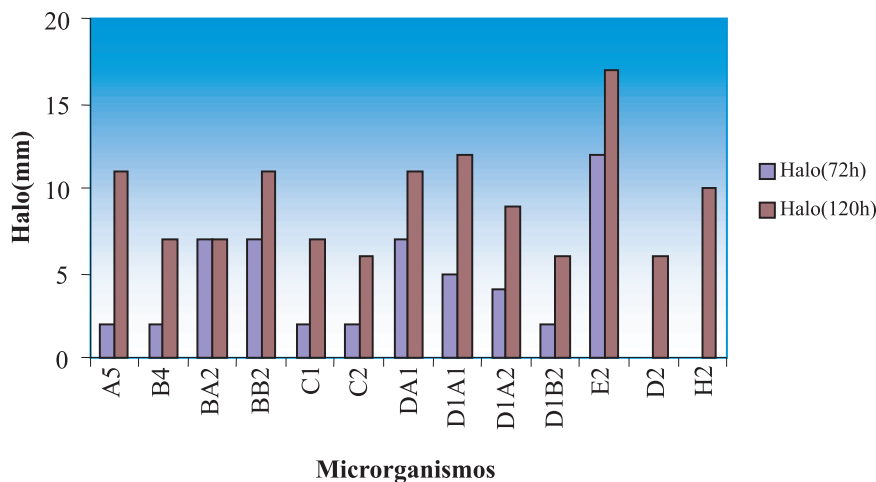


Figura 1. Diâmetro dos halos azuis das bactérias caracterizadas como produtoras de raminolipídeo.

tensões superficiais e interfaciais as quais devem atingir valores menores que 30 e 1 mN/m, respectivamente (Muligan, 1993).

Um outro parâmetro muito utilizado para avaliar o comportamento do surfactante é o valor do balanço hidrofílico - lipofílico (HLB). Segundo Parkinsom (1985) surfactantes com HLB menor que 6 são mais solúveis na fase oleosa, enquanto valores entre 10 e 18 exibem características opostas (Desai e Banat, 1997). A adição de um bom surfactante na água pode diminuir a tensão superficial e interfacial a 20°C de 72 para 30 mN/m (Kosaric, 1996).

Os surfactantes são aplicados em áreas como agricultura para a formulação de herbicidas e pesticidas, na indústria alimentícia como aditivo em condimentos, nas indústrias farmacêuticas, têxtil e cosmética (Yamane, 1987; Lin *et al.*, 1993; Shephord *et al.*, 1995). Entretanto, o maior mercado para os surfactantes é na indústria petrolífera, onde são amplamente utilizados para a recuperação terciária do petróleo (MEOR - Microbial Enhanced Oil Recovery), como na

remoção e mobilização de resíduos de óleo e biorremediação (Desai e Banat, 1997; Ron e Rosenberg, 2002).

Surfactantes microbianos ou biosurfactantes são metabólitos microbianos de superfície ativa, que apresentam moléculas com porções hidrofílicas e hidrofóbicas que tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluídas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). Estas propriedades promovem a redução da tensão superficial e interfacial, conferindo a capacidade de detergência, emulsificação, lubrificação, solubilização e dispersão de fases (Desai e Banat, 1997). A porção hidrofílica é constituída por grupamentos aniônicos, catiônicos, não-aniônicos ou anfóteros, enquanto que, a parte hidrofóbica, geralmente é um hidrocarboneto linear ou ramificado apresentando ou não duplas ligações e/ou grupos aromáticos (Georgiou *et al.*, 1992). Os surfactantes microbianos são produzidos principalmente por bactérias, embora fungos e leveduras também os produzam (Fiechter, 1992).

A maioria dos surfactantes utilizados comercialmente é sintetizada a partir de derivados do petróleo.

Entretanto, nos últimos anos o interesse por surfactantes de origem microbiana tem aumentado significativamente em decorrência de serem naturalmente biodegradáveis diminuindo assim o impacto ambiental (Makkar e Cameotra, 2002). Os biosurfactantes apresentam inúmeras vantagens sobre os surfactantes de origem química, tais como, baixa toxicidade, tolerância à temperatura, pH e força iônica, além de serem biodegradáveis na água e no solo (Lin, 1996).

Segundo Georgiou *et al.* (1992), uma grande variedade de microrganismos produz biosurfactantes, sendo que o tipo, a quantidade e a qualidade do biosurfactante são influenciados pela natureza do substrato, concentração de íons como P, N, Mg, O₂, e Fe⁻ no meio de cultura, além das condições de cultivo.

Os surfactantes sintéticos são classificados pela natureza do seu grupo polar, enquanto que os biosurfactantes são diferenciados por sua natureza bioquímica e pela espécie microbiana produtora (Desai & Desai, 1993). As principais classes incluem os glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, biosurfactantes poliméricos, fosfolipídeos e ácidos graxos (Georgiou *et al.*, 1992; Desai e Banat, 1997).

Uma ampla diversidade de biosurfactantes de origem microbiana pode ser observada na Tabela 1.

A classe dos glicolipídeos compreende um grupo dos mais conhecidos e estudados, apresentando longas cadeias de ácidos alifáticos ou ácidos hidroalifáticos. Nesta classe destacam-se os raminolipídeos, trealolipídeos e soforolipídeos (Reis, 1998).

Os raminolipídeos são formados por uma ou duas moléculas de raminose, ligadas a uma ou duas moléculas de ácido b-hidroxidecanoico (Desai e Banat, 1997). Foram isolados pela primeira vez por Bergstrom *et al.* (1946) de *Pseudomonas pyocyanea*. Posteriormente, Jarvis e Johnson em 1949 mostraram uma ligação glicosídica de b-hidroxidecanoil-b-hidroxidecanoato com duas moléculas de raminose em cultivo de *P. aeruginosa* com 3% (v/v) de glicerol.

Os raminolipídeos produzidos por *Pseudomonas* spp. têm a capacidade de diminuir a tensão interfacial

Tabela 1- Diversidade de surfactantes de origem microbiana (Mulligan et al., 2001).

Microrganismos	Biosurfactantes
<i>Bacillus licheniformis</i>	Lipopeptídeo
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactina
<i>Bacillus sp.</i>	Raminolipídeo
<i>Candida bombicol</i>	Soforolipídeo
<i>Candida lipolytica Y-917</i>	Soforolipídeo
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Fosfolipídeo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Raminolipídeo
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipopeptídeo
<i>Rhodococcus sp.</i>	Glicolipídeo

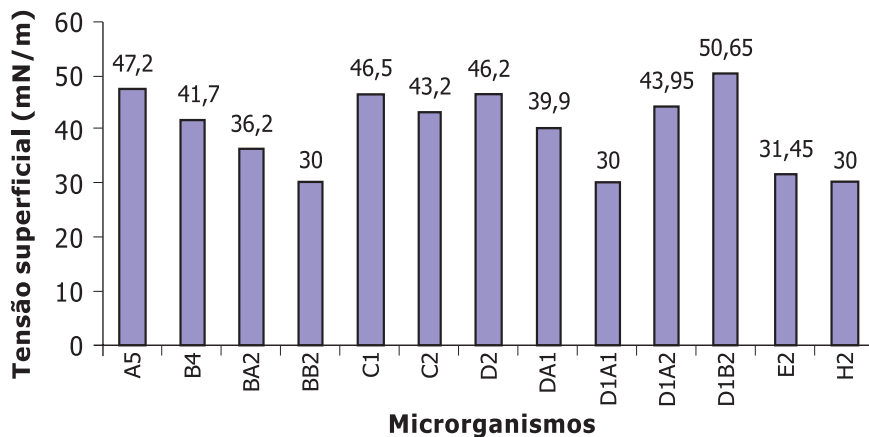


Figura 2. Tensão superficial obtida durante cultivo em frascos agitados em meio MLR contendo glicose como fonte de carbono.

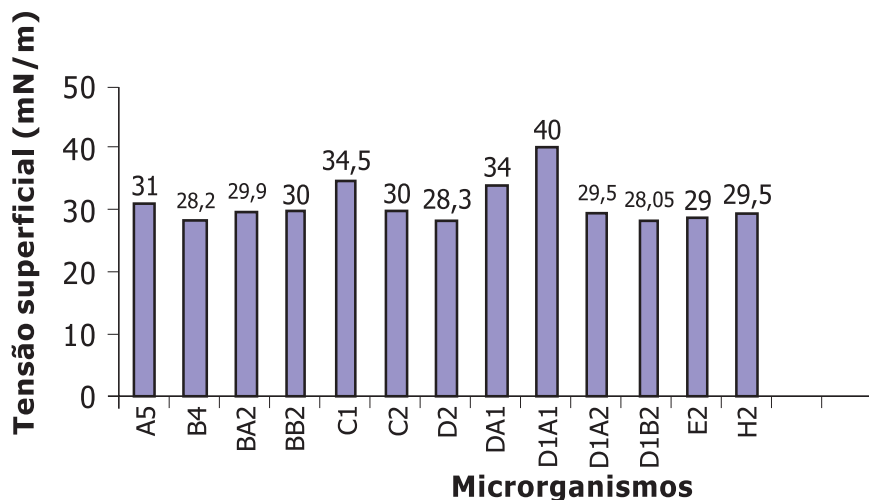


Figura 3. Tensão superficial obtida durante cultivo em frascos agitados em meio MG contendo glicerol como fonte de carbono.

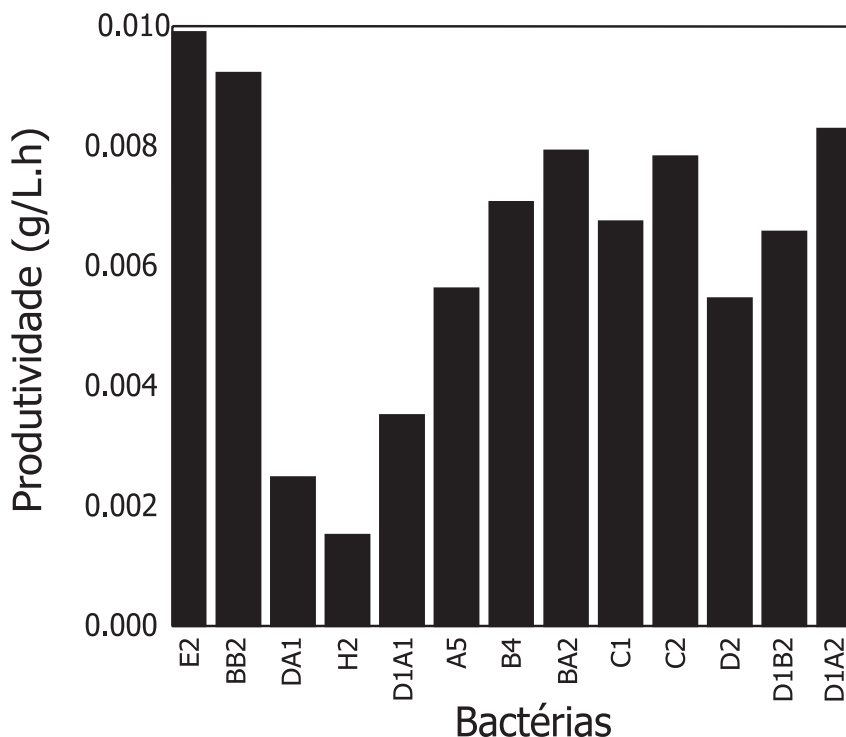


Figura 4. Produtividade em raminose obtidas durante as fermentações com as 13 bactérias produtoras de raminolipídeos.

contra n-hexadecano para 1 mN/m e a tensão superficial para 25 a 30 mN/m (Lang e Wagner, 1987). Além de reduzirem a tensão superficial, estabilizam emulsões e são geralmente atóxicos e biodegradáveis (Banat *et al.*, 2000). Estes biossurfactantes também são uma fonte de L-raminose, usada na produção de condimentos de alta qualidade e também como matéria-prima para a síntese de alguns compostos orgânicos (Linhardt *et al.*, 1989).

Embora o potencial de produção seja determinado pela genética do microrganismo, outros fatores como as condições ambientais e a natureza do substrato também influenciam no nível de expressão (Rahman *et al.*, 2002). *P. aeruginosa* pode utilizar substratos como alcanos, piruvato, glicerol, succinato, frutose, óleo de oliva, glicose e manitol para produzir raminolipídeos (Mulligan *et al.*, 2001).

Em decorrência da importância dos biossurfactantes, este trabalho teve como objetivo investigar a produção destes compostos por bactérias isoladas de poços de petróleo.

2. Materiais e Métodos

Microrganismos

Foram utilizadas 40 bactérias, 20 Gram-positivas e 20 Gram-negativas, pertencentes à coleção de culturas de microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE (DAUFPE), isoladas de poços de petróleo de Canto do Amaro/Mossoró/RN (Tabela 2).

Meios de Cultura

A manutenção das bactérias Gram-negativas foi realizada em meio de cultura MPK (King *et al.*, 1954) e das bactérias Gram-positivas em meio Triptona de Soja Ágar - TSA, que contém (em g/l): Trypticase - 15; NaCl - 5; Peptona de soja - 5; Ágar - 15 e pH 7,0.

Na seleção primária de bactérias como produtoras de raminolipídeos foi utilizado o meio MMR como proposto por Siegmund e Wagner (1991).

A investigação sobre a biodegradação de hidrocarbonetos foi realizada utilizando-se o meio mineral Buchnell e Haas (BH), adicionado de petróleo como fonte de carbono.

Tabela 2. Relação das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas isoladas de poços de petróleo do Canto do Amaro (RN) e utilizadas neste trabalho.

Bactérias Gram-negativas			Bactérias Gram-positivas		
N.º da Coleção DAUFPE*	Poços de Origem	Código	N.º da Coleção DAUFPE*	Poços de Origem	Código
509	AP-29	G4	511	AP-29	H2
568	AP-44	DB1	522	AP-29	1B
569	AP-44	D1A1	523	AP-29	1C
570	AP-44	BA2	529	AP-29	21
571	AP-44	D1A2	530	AP-29	6
572	AP-44	BB2	532	AP-29	18
573	AP-44	DA1	534	AP-29	9B
574	AP-44	D1B1	535	AP-29	24A
575	AP-44	D1B2	539	AP-29	13A
592	AP-44	17C	540	AP-29	13B
602	AP-44	25B	544	AP-29	14
610	AP-194	A5	545	AP-29	25
611	AP-194	B4	580	AP-44	23B
612	AP-194	C1	588	AP-44	6B
613	AP-194	C2	589	AP-44	6C
614	AP-194	D2	596	AP-44	24
615	AP-194	E2	598	AP-44	29B
618	AP-194	A5 (SAB)	599	AP-44	14A
621	AP-194	D4	601	AP-44	25A
528	AP-29	5C	603	AP-44	25C

* DAUFPE: Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da UFPE.

Para a produção de raminolipídeos tendo glicerol como fonte de carbono foi utilizado o meio descrito por Santa Anna *et al.* (2002). O meio descrito por Abu-Ruwaida *et al.* (1991) foi utilizado quando glicose foi a fonte de carbono.

Seleção Primária para Caracterização das Bactérias como Produtoras de Biosurfactante Raminolipídico

Neste ensaio semiquantitativo, segundo a metodologia descrita por Sigmund e Wagner (1991), o raminolipídeo aniônico forma um par iônico insolúvel com o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), na presença de azul de metileno, formando um halo azul escuro em volta da colônia.

Um volume de 3 µl de suspensão de bactéria a 10⁹ Unidades Formadoras de Colônias por ml (UFC/ml), de cada linhagem, foi inoculada em meio sólido contendo CTAB e azul de metileno. Em seguida as placas foram cultivadas a 30°C por 120 horas.

Identificação das Bactérias

As bactérias Gram-negativas, inicialmente selecionadas como produtoras de raminolipídeos, foram iden-

tificadas através das características bioquímicas, com a utilização do Kit Bac Tray III específico para bactérias Gram-negativas (Difco).

Cultivos em Frascos Agitados

A investigação da produção de biosurfactantes raminolipídicos foi realizada através de cultivos em mesa incubadora rotativa. Inicialmente as bactérias foram cultivadas em meio sólido MPK a 30°C. Após 24 horas, foram inoculadas em frascos Erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml do meio de produção e incubadas sob agitação, a 30°C, 250 rpm durante 24 horas. Após este período, 2 ml de cada bactéria foi inoculado em 48 ml do meio de produção, contidos em frascos Erlenmeyer de 250 ml a incubação foi realizada nas mesmas condições da etapa anterior. Durante os cultivos foram retiradas amostras em intervalos de 24 horas, as quais foram centrifugadas a 11.000 rpm durante 5 minutos e submetidas às seguintes análises:

- Tensão superficial - a tensão superficial do caldo livre de células foi medida usando um tensiômetro CSC-Du Nouy (705) à temperatura ambiente;
- Concentração de raminose - a

quantificação de raminolipídeos expressa em raminose, foi avaliada pelo método colorimétrico do fenol ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956);

c) Concentração de biomassa – um volume conhecido da amostra foi centrifugado em tubos de eppendorfs (pesados previamente – P1) a 11000 rpm, durante 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido para análises posteriores e os tubos de eppendorfs contendo a biomassa foram colocados em estufa a 80°C. Após 24 horas, os tubos foram pesados (P2). A concentração de biomassa expressa em g.l⁻¹ foi obtida pela equação: $(P_2 - P_1) / V(L)$, onde V foi o volume centrifugado em litro.

Degradação de Petróleo

No ensaio de degradação de petróleo foi utilizada a metodologia de Brown e Braddock (1990) modificada, uma vez que no presente trabalho o ensaio foi realizado em tubos e a concentração de raminose foi determinada. Os tubos de ensaio continham o meio BH, o inóculo e o petróleo bruto. O tubo controle negativo não continha inóculo. Todos os tubos foram incubados a 30°C por 20 dias.

Tabela 3. Produtividade em raminose e redução da tensão superficial obtida durante as fermentações com as 13 bactérias caracterizadas como produtoras de raminolipídeos.

Bactérias selecionadas na seleção primária	Produtividade em Raminose(g/l)	Tensão Superficial Inicial(mN/m)	Tensão Superficial Final (mN/m)	Redução da Tensão Superficial (%)
<i>Pseudomonas sp.</i> 615-E2	0,0099	40,00	29,00	27,50
<i>P. aeruginosa</i> -572-BB2	0,0092	35,50	30,00	15,50
<i>P. aeruginosa</i> -571-D1A2	0,0083	33,55	29,80	11,18
<i>Pseudomonas sp.</i> 570-BA2	0,0079	37,00	29,45	20,41
<i>P. aeruginosa</i> -613-C2	0,0078	37,50	30,00	20,00
<i>P. aeruginosa</i> -611-B4	0,0071	36,25	28,20	22,21
<i>P. aeruginosa</i> -612-C1	0,0068	44,65	34,05	23,74
<i>P. aeruginosa</i> -575-D1B2	0,0066	33,2	28,7	13,55
<i>P. aeruginosa</i> 610-A5	0,0056	40,00	38,50	3,75
<i>P. aeruginosa</i> -614-D2	0,0055	45,30	28,30	37,53
<i>P. aeruginosa</i> -569-D1A1	0,0035	41,00	40,00	2,45
<i>P. aeruginosa</i> -573-DA1	0,0025	39,50	35,00	11,40
<i>Bacillus sp.</i> -511-H2	0,00015	35,00	30,00	14,29

Tabela 4. Resultados dos ensaios de degradação de petróleo pelas 13 bactérias selecionadas inicialmente como produtoras de biossurfactantes raminolipídico.

Nº da coleção DAUFPE	Código	Degradação de petróleo bruto
610	A5	++
611	B4	+++
570	BA2	++
572	BB2	++
612	C1	+++
613	C2	+++
614	D2	+++
573	DA1	+++
569	D1A1	++
571	D1A2	+++
575	D1B2	+++
615	E2	+++
511	H2	++

++ Degradação parcial; +++ Degradação total

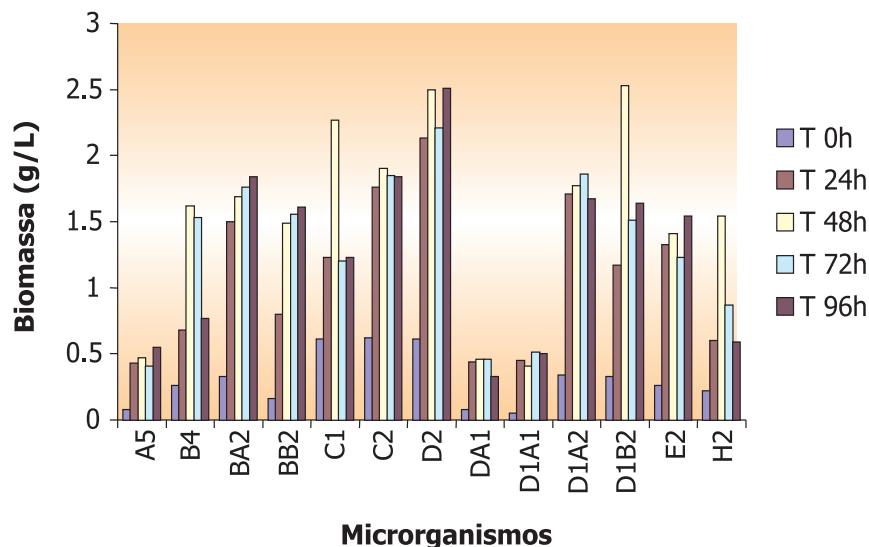


Figura 5. Biomassa obtida durante os cultivos em frascos agitados em meio MG contendo glicerol como fonte de carbono.

3. Resultados e Discussão

Caracterização das Bactérias Isoladas de Poços de Petróleo

Na seleção primária das bactérias para a caracterização como produtoras de biossurfactantes raminolipídicos, 27,5% (11) das bactérias Gram-negativas deram resultados positivos após 72 horas de cultivo (Figura 1).

Das 20 bactérias Gram-positivas utilizadas, apenas a linhagem DAUFPE-511 (H2) foi caracterizada como produtora de biossurfactante raminolipídico. Por outro lado, das 20 linhagens Gram-negativas, 12 (60%) exibiram a formação de halo azul nessa seleção primária.

A identificação bioquímica das 12 bactérias Gram-negativas permitiu o conhecimento da espécie. Com exceção das bactérias *Pseudomonas sp.* 570-BA2, e *Pseudomonas sp.* 615-E2, todas foram identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*.

Produção de Biossurfactantes Raminolipídico em Frascos Agitados

A partir da seleção primária, as 13 linhagens positivas para raminolipídeo foram utilizadas para a investigação da produção deste biossurfactante em meios líquidos contendo glicose ou glicerol como fontes de carbono.

Uma vez que os biossurfactantes podem ser produzidos em substratos solúveis em água, inicialmente, as 13 bactérias foram cultivadas em meio

MLR, contendo glicose como fonte de carbono e tensão superficial de 58mN/m. Nos resultados apresentados na Figura 2, a tensão superficial alcançou o valor mínimo de 30mN/m para as bactérias BB2, D1A1 e H2.

Na Figura 3 podem ser observadas as tensões superficiais obtidas durante o cultivo em frascos agitados em meio MG contendo glicerol como fonte de carbono. Estes resultados comparados com aqueles obtidos com o meio MRL (Figura 2) indicam o glicerol como uma fonte de carbono mais apropriada para a produção de raminolípido do que a glicose. A análise destes resultados indica que estas linhagens se destacam como boas produtoras de raminolípido quando a fonte de carbono é glicerol, corroborando com os resultados obtidos por Mulligan e Gibbs (1989), os quais comprovaram que a composição do meio de cultura influencia diretamente na produção do biossurfactante.

Com relação à quantificação da raminose, apenas as amostras dos ensaios com o meio MG foram utilizadas. A Figura 4 apresenta os valores de produtividade em raminose obtidos durante as fermentações com as 13 bactérias produtoras de raminolípido em meio MG. A produtividade em raminose foi calculada considerando o maior valor de concentração dividido pelo respectivo tempo, sendo o tempo de produção máxima entre 72 e 96 horas de cultivo.

Os maiores valores foram observados para as bactérias *Pseudomonas* sp. 615-E2, *P. aeruginosa*-572-BB2, *Pseudomonas* sp. 570-BA2, *P. aeruginosa*-613-C2 e *P. aeruginosa*-571-D1A2. Todas estas bactérias produziram valores superiores a 0,007g/l.h. A produtividade obtida por Santa Anna *et al.* (2002) utilizando o mesmo meio de cultura e *Pseudomonas aeruginosa* PA1 foi de 0,0069g/l.h. Valores superiores de produtividade são geralmente obtidos em cultivos em batelada alimentada. Rahman *et al.* (2002) obtiveram produtividade maior que 0,03g/l.h quando foram adicionados óleo de soja ou glicerol após 46, 144 e 192 horas, em cultivos com *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129.

A Tabela 3 apresenta os valores de tensão superficial e de produtividade em raminose obtidos nos ensaios com o meio MG. Observa-se nesta Tabela que nem sempre os maiores valores de concentração de raminose

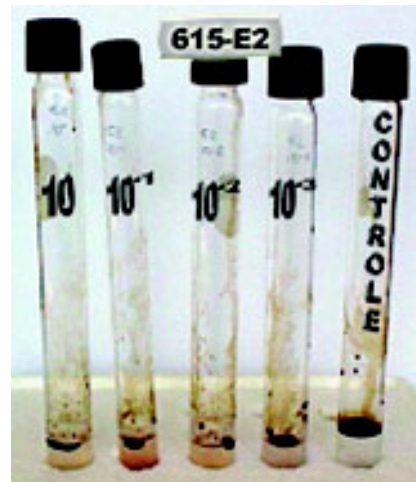
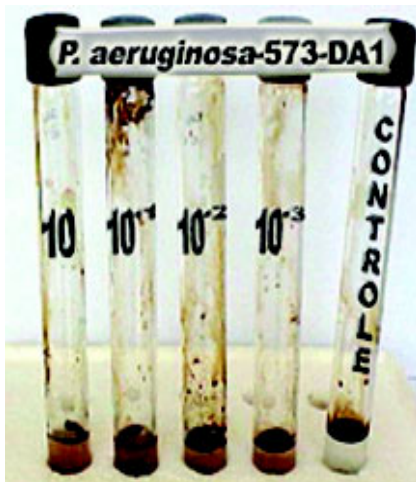


Figura 6. Aspecto macroscópico de degradação do petróleo pelas bactérias *P. aeruginosa* 573-DA1 e *Pseudomonas* sp. 615-E2.

correspondem aos menores valores de tensão superficial, indicando a importância de quantificar a produção de raminolípido. A medida da tensão superficial serve apenas como uma medida indireta da produção de biossurfactantes.

Santa Anna *et al.* (2002) também observaram que quando utilizaram óleo parafínico como fonte de carbono para a produção de raminolípido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1, a redução da tensão superficial foi de apenas 4,4%, sendo produzido 260 mg/l; por outro lado, quando a fonte de carbono foi n-hexadecano, a redução da tensão foi de 47,4% e a concentração de raminose igual a 130 mg/l.

Conforme a Tabela 3, as linhagens 611-B4, 575-D1B2 e 614-D2 apresentaram os menores valores de tensão superficial, 28,2; 28,7 e 28,3 mN/m, respectivamente. Segundo Desai e Banat (1997), a tensão superficial durante a produção de raminolípido por *P. aeruginosa* pode chegar a 29 mN/m, de forma que os valores mínimos de tensão superficial encontrados no presente trabalho são similares aos relatados na literatura.

A maioria das bactérias apresentou crescimento máximo com 48 horas de cultivo, sendo a maior concentração de biomassa observada (Figura 5) para a linhagem *P. aeruginosa*-575-D1B2, que alcançou 2,53 g/l. Con-

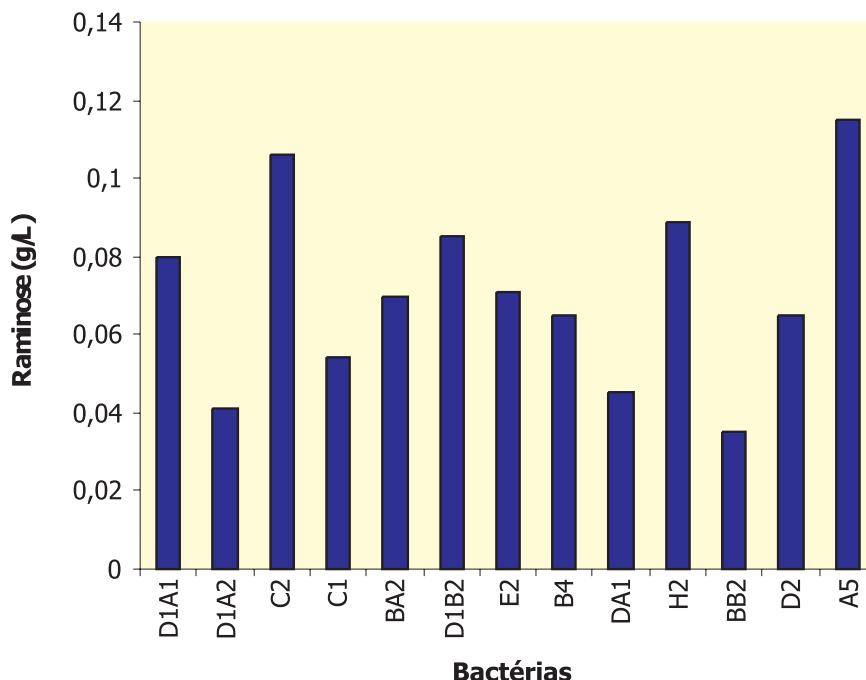


Figura 7. Produção de biossurfactante raminolípido produzido pelas 13 bactérias em meio mineral BH contendo petróleo.

centração de biomassa maior que 5g/l foi encontrado na literatura apenas quando glicerol foi adicionado após a fase exponencial de crescimento durante fermentação com *P. aeruginosa* em meio contendo glicose como fonte de carbono (Rahman *et al.*, 2002).

A produção de biosurfactante raminolipídico foi não associada ao crescimento, tendo em vista que sua concentração máxima foi obtida durante a fase estacionária de crescimento, típico de um metabólito secundário. Outros autores também observaram produção de raminolipídeos na fase estacionária (Ron e Rosemberg, 2002; Santa Anna *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 2002).

Experimentos para a Degradação de Petróleo

As 13 linhagens caracterizadas como produtoras de biosurfactantes raminolipídico foram utilizadas nos ensaios de degradação de petróleo. O petróleo foi totalmente ou parcialmente degradado como podem ser observados na Figura 6 e na Tabela 4, pelo desaparecimento e emulsificação do óleo.

Para confirmar se durante a degradação do petróleo ocorreu a produção do biosurfactante raminolipídico foi determinada a concentração de raminose. De acordo com os resultados apresentados na Figura 7, as bactérias produziram biosurfactante raminolipídico. Nestes resultados vê-se o potencial destas linhagens em produzir biosurfactantes raminolipídico, utilizando petróleo bruto como fonte de carbono, o que apresenta ser de grande importância para a biorremediação de áreas contaminadas por derramamento de petróleo. Segundo Rahman *et al.* (2003), bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, produzem raminolipídeo pela utilizando hidrocarbonetos.

A importância de determinar a concentração de raminose consistiu no fato de que a análise visual apresentada na Tabela 4 não concorda com os resultados apresentados na Figura 7, para todas as bactérias investigadas. A bactéria *P. aeruginosa* 610-A5, por exemplo, apresentou resultado visual parcial e um dos maiores valores de concentração de raminose. Brown e Braddock (1990) não determinaram a concentração de

raminose, apresentando apenas o resultado visual.

Das 40 bactérias isoladas de diferentes poços de petróleo, 13, sendo 12 Gram-negativas e 1 Gram-positiva, foram caracterizadas como produtoras de biosurfactantes raminolipídico tanto utilizando glicerol, como petróleo bruto, como fonte de carbono.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa) pelo apoio financeiro recebido.

4. Referências Bibliográficas

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.

BROWN, E.J.; BRADDOCK, J.F. Sheen screen, a miniaturized most-probable-number method for enumeration of oil-degrading microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3895-3896, 1990.

DESAI, A. J.; BANAT, I.M. Emulsifier production by *Pseudomonas fluorescens* during the growth on hydrocarbons. **Current Science**, v. 57, p. 500-501, 1997.

DUBOIS, M., K.A. GILLES, HAMILTON, J. K., REBERS. AND SMITH, FRED Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

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

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

JARVIS, F.G.; JONSON, M.J. A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal American Chemical Society**, v. 71, p. 4124-4126, 1949.

KING, E.O., WARD, M.K. E RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **J. Lab. Clin. Med.** v. 44, p. 301, 1954.

KOSARIC, N. Biosurfactants. In: RHEN, H.J.; REED, G. (eds). **Biotechnology**, cap. 17, 1996.

LANG, S.; WAGNER, F. Structure and properties of biosurfactants. In: KOSARIC, N.;

CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. (eds). **Biosurfactant and Biotechnology**, p. 21-47, 1987.

LIN, S.C.; SHARMA, M.M.; GEORGIOU, G. Production and deactivation of biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2. **Biotechnology Program**, v 9, p. 138-145, 1993.

LINHARDT, R.J.; BAKHIT, R.; DANIELS, L.; MAYERL, F.; PICKENHAGEN, W. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. **Biotechnology Bioeng.** v. 33. p. 365-368, 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.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 58, p. 428-34, 2002.

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

REIS, F.A.S.L. **Estudo da síntese de biosurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC6633**. 1998. 107f. Dissertação de Mestrado (em tecnologia de processos químicos e bioquímicos), Escola de química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ.

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

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 exerted by *Pseudomonas* species grown on mineral agar. **Biotechnology Letters**, v. 95, p. 95-100, 1993.

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