

BIANCA MENDES MACIEL

ESTUDOS PROSPECTIVOS DE MICRORGANISMOS DE SOLO DE *LANDFARM*
COM POTENCIAIS APLICAÇÕES EM ESTRATÉGIAS DE BIORREMEDIAÇÃO
DE ÁREAS CONTAMINADAS POR PETRÓLEO

ILHÉUS – BAHIA - BRASIL

Junho de 2004

BIANCA MENDES MACIEL

**ESTUDOS PROSPECTIVOS DE MICRORGANISMOS DE SOLO DE *LANDFARM*
COM POTENCIAIS APLICAÇÕES EM ESTRATÉGIAS DE BIORREMEDIAÇÃO
DE ÁREAS CONTAMINADAS POR PETRÓLEO**

**Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Genética e Biologia
Molecular**

APROVADA: 18 de junho de 2004

**Dr Valter Roberto Linardi
UFMG / ICB**

**Dr. João Carlos Teixeira Dias
UESC/DCB**

**Dr^a Rachel Passos Rezende
UESC / DCB
(Orientadora)**

DEDICATÓRIA

Ao meu grande amor e amigo, Caio. Que consigamos passar por novos desafios sempre juntos, nos amando a cada dia um pouco mais.

AGRADECIMENTOS

Como encontrar as palavras certas que consigam expressar o real sentimento de gratidão e amizade que sinto por todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram na realização deste trabalho? Jamais imaginei que esta seria a parte mais difícil de escrever! Como traduzir este sentimento que tanto me conforta e valorizo e que a cada momento me emociona? Hoje, considero que uma importante etapa na minha vida se seguiu, mas jamais ficará no esquecimento, porque a lembrança deste tempo ficará eternamente registrada em minha memória. A família, os amigos, o laboratório, os professores, a Universidade, a cidade, tudo será lembrado com muito carinho, preenchendo a saudade deste tempo tão maravilhoso. Como passou rápido! Como aprendi! Como cresci!

A Rachel, minha grande e eterna Amiga que tive a sorte de encontrar. Um presente que Deus colocou em minha vida para que eu nunca me sinta só. Você, sem dúvida foi o melhor que me aconteceu neste momento. Sua amizade é a maior riqueza que conquistei nesta cidade e que irei cultivar por toda a vida. Acho que conseguimos algo muito raro que foi conciliar a amizade, o respeito, a admiração e a orientação! Por falar em orientação, tenho medo de ter ficado mal acostumada com uma orientação tão completa e perfeita que recebi, que equipe! João, como o eterno “orientador” de todos, meu grande amigo e conselheiro, com idéias brilhantes que o faz destacar dentro da área científica. Leandro, como meu co-orientador e amigo, uma pessoa com um sentimento de humanidade marcante, um educador nato que nunca deixou de me atender quando precisei, uma pessoa sempre disposta a ajudar o próximo e, acima de tudo, apaixonado pela Ciência. Sinto-me honrada e privilegiada por esta orientação. Com certeza ainda iremos trabalhar muito juntos!

A toda a equipe do laboratório de Monitoramento Ambiental, Lizzi, Aninha, Danilo, Adriana, Natália e Bruno. Pessoas fantásticas que nunca me negaram ajuda, sem vocês este trabalho não teria sido completo. Vocês devem estar pensando que me esqueci do Ronaldo e Vinícius, nunca! Gostaria de agradecê-los separadamente. Espero não causar ciúmes no restante da equipe, mas estas duas pessoas, tão fantásticas, inconscientemente tiveram um papel muito importante na minha vida, sendo os responsáveis por me tornar uma pessoa profissionalmente melhor. Obrigado!

A todos os meus amigos de turma, Dri, Joci, Geruza, Jeizoca, Ronald, Alfredo, Cris, Paty e Livia. Nós fomos e sempre seremos a melhor turma que este mestrado já teve e terá! Jamais imaginei que um dia iria sentir saudade da Estatística, mas, sem dúvida alguma, foi o período do curso mais importante para o fortalecimento dos nossos laços de amizade. Foi nesta época que percebi que unidos iremos longe! Agora, nossas aulas irão continuar fora da sala de aula, num churrasco, numa festa, num barzinho, na praia e em qualquer outro encontro de descontração...

Aos técnicos e amigos, “Meleca”, “Pelezete” e “Jacete”, sempre dispostos a ajudar e a contagiar a todos com um eterno bom humor. Meu reconhecimento a toda equipe da GERLAB, em especial a Ivon e Geraldo.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, os quais eu tive o privilégio de ter tido aulas. Em especial aos professores Leandro, Rachel, João, Janizete, Júlio, Ronan, José Luiz Pires, Dr^a Edna e Dr. Bezerra. Espero poder contribuir na vida acadêmica com os ensinamentos de vocês. Gostaria de fazer um agradecimento especial à coordenação do curso que, com muita competência, tem lutado pela melhoria da qualidade deste Mestrado, tanto dentro da Universidade quanto em todo o Brasil. Mônica, não esqueci de você...

Finalmente, o parágrafo mais difícil: minha família... Será que preciso escrever para agradecê-los? Ou basta amá-los? Eu acredito que o Amor é o sentimento mais nobre que um ser humano pode sentir. O amor é incondicional, não exige troca, nos torna felizes simplesmente por amar. Amar somente por amar. E eu amo vocês, infinitamente, incondicionalmente, admiravelmente, eternamente...

M152

Maciel, Bianca Mendes.

Estudos prospectivos de microrganismos de solo de Landfarm com potenciais aplicações em estratégias de biorremediação de áreas contaminadas por petróleo / Bianca Mendes Maciel. – Ilhéus, Ba : UESC, 2004. 87f. : il.

Orientadora: Rachel Passos Rezende

Co-orientador: Leandro Lopes Loguercio.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz.

Bibliografia: f. 77-87.

1. Biodegradação. 2. Biorremediação. 3. Resíduos industriais – Purificação. 4. Microrganismos. 5. Biotecnologia. 6. Indústria petroquímica. I. Título.

CDD 628.445

EXTRATO

MACIEL, Bianca Mendes, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, junho de 2004. **Estudos prospectivos de microrganismos de solo de *landfarm* com potenciais aplicações em estratégias de biorremediação de áreas contaminadas por petróleo.** Orientadora: Prof^a Dr^a Rachel Passos Rezende. Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Lopes Loguercio. Colaborador: Dr. João Carlos Teixeira Dias.

A indústria de petróleo, em suas diversas atividades, apresenta um risco ambiental inerente que precisa ser constantemente gerenciado. Os microrganismos desempenham uma função importante em processos de biorremediação com o propósito de eliminar ou minimizar o prejuízo causado pelo óleo e seus derivados. Assim, o estudo da microbiota indígena de áreas contaminadas por petróleo permite a seleção de organismos potenciais degradadores, produtores de compostos com aplicações biotecnológicas na indústria petroquímica. Os biossurfactantes, por exemplo, são amplamente utilizados na biorremediação de petróleo em decorrência de sua biodegradabilidade e ausência de toxicidade. No entanto, sabendo que apenas uma pequena fração das espécies microbianas pode ser isolada e caracterizada pelos métodos tradicionais de cultivo, o desenvolvimento de técnicas moleculares para a análise dos ácidos nucleicos tem permitido um estudo mais fidedigno da ecologia e diversidade microbiana em amostras ambientais. Este trabalho teve como objetivos (i) o isolamento de microrganismos presentes em solo de *landfarm* da refinaria Landulpho Alves (São Francisco do Conde / BA), capazes de utilizar petróleo como única fonte de carbono; (ii) a produção de compostos com atividade surfactante e sua potencial aplicabilidade na indústria petroquímica; e (iii) a padronização de uma metodologia simples para a extração do DNA microbiano total do solo de *landfarm* para estudos futuros da caracterização molecular da diversidade microbiana.

Amostras de solo de *landfarm* foram coletadas em frascos de alumínio e transportadas para o Laboratório de Monitoramento Ambiental da Universidade Estadual de Santa Cruz para serem processadas. Como controle negativo foi utilizado amostras de solo proveniente da Mata Atlântica. Para o isolamento microbiano, as amostras dos dois tipos de solo foram incubadas separadamente em tampão fosfato sob agitação constante a 200 rpm, durante 21 dias, à temperatura ambiente. Nos dias 0, 3, 7, 14 e 21, alíquotas de 1mL foram diluídas serialmente e plaqueadas em meio rico (para observação do crescimento de heterotróficos totais) e em meio de degradação contendo 2% de petróleo como única fonte de carbono. Os microrganismos isolados a partir do meio de degradação foram selecionados para a produção de compostos com atividade surfactante através da técnica qualitativa do colapso da gota em diversos tipos de óleos. Com a finalidade de relacionar a atividade surfactante ao crescimento microbiano, a curva de crescimento dos isolados foi determinada. A quantificação da atividade surfactante foi determinada através de diluições crescentes dos sobrenadantes das culturas microbianas até encontrar a máxima diluição ainda capaz de surfactar petróleo pela técnica do colapso a gota.

O protocolo de extração do DNA total da comunidade microbiana presente no solo de *landfarm* foi padronizado utilizando um método de lise direta através da maceração do solo com nitrogênio líquido e extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). A eficiência do método de extração foi confirmada através da amplificação por PCR utilizando primers para o gene 16S do RNA ribossomal.

A partir de amostras do solo do *landfarm* foram isoladas 60 linhagens de microrganismos capazes de crescer em meio de degradação, contendo petróleo como única fonte de carbono. O máximo de crescimento de heterotróficos totais (10^{11} ufc.mL⁻¹) ocorreu no sétimo dia de incubação em tampão fosfato nos dois tipos de solo, ocorrendo decréscimo após este período. O crescimento microbiano no meio de degradação foi intenso no solo impactado, tendo o seu máximo ($8,7 \times 10^9$ ufc.mL⁻¹) no 14º dia de incubação. No solo não impactado, os microrganismos foram incapazes de crescer no meio de degradação contendo petróleo como única fonte de carbono, demonstrando que este composto funcionou como um agente selecionador, no qual apenas os microrganismos indígenas do *landfarm* adaptados conseguem se desenvolver e, provavelmente, possuir atividade biodegradadora. Destas 60 linhagens, 11 foram selecionadas pela capacidade de produzir compostos com atividade surfactante em diferentes tipos de óleos (óleo mineral, petróleo, óleo diesel, óleo de soja e azeite de oliva). A curva de crescimento microbiano demonstrou quatro padrões distintos entre os 11 isolados. Para todos, entretanto, o início da atividade surfactante ocorreu durante a fase de declínio, aproximadamente entre 90 e 96 horas de crescimento, e uma segunda fase estacionária, com duração de aproximadamente 24 h, foi observada imediatamente após o início da atividade surfactante. Esta interrupção momentânea da tendência de declínio após a detecção da atividade surfactante sugere que os compostos surfactantes produzidos e secretados pelas células causam uma mudança na condição nutricional do meio, disponibilizando outras fontes de carbono para o crescimento celular. Com relação à quantificação da atividade surfactante, foi possível observar diferenças consistentes e reproduzíveis entre os isolados. Em geral, não houve associação direta entre a maior atividade surfactante e a maior produção de biomassa microbiana. Os 11 isolados selecionados neste trabalho apresentaram diferenças entre si quanto à morfologia das colônias, coloração do sobrenadante, padrão de crescimento e atividade surfactante.

Neste trabalho, sugerimos um protocolo simples de extração do DNA microbiano total por um método de lise direta com N₂ líquido. Este método demonstrou ser eficiente para o solo de *landfarm*, gerando produtos de alto peso molecular que indicam a presença de muitos organismos no solo. No entanto, a lise direta gera a extração de produtos que inibem a atividade da *Taq* DNA polimerase, como os ácidos húmico e fúlvico, sendo necessária, portanto, uma etapa de purificação do DNA extraído. Nenhum protocolo de extração de DNA para o estudo da microbiota autóctone é universalmente aplicável; cada tipo de amostra, dependendo de sua natureza, requer a otimização de um método próprio que permita a extração de grande quantidade de DNA de boa qualidade para as análises moleculares.

O solo de *landfarm* é composto por uma diversidade microbiana adaptada ao petróleo, extremamente importante no processo de biodegradação. O estudo da diversidade microbiana autóctone torna-se fundamental para a compreensão das

funções exercidas pelos microrganismos nos ambientes contaminados e para o conhecimento das suas interações com os demais habitantes da biodiversidade. Microrganismos autóctones, produtores de compostos surfactantes, assim como todos aqueles (cultiváveis e não cultiváveis) participantes do consórcio microbiano, necessitam ser estudados com o objetivo de direcionar e otimizar estratégias de biorremediação dos locais contaminados.

PALAVRAS-CHAVE: Biosurfactantes, diversidade microbiana, biodegradação de petróleo, biorremediação, landfarm, petroquímica.

ABSTRACT

The petrochemical industry, in their several activities, poses environmental risks that need to be constantly managed. The microorganisms have an important role in bioremediation processes with the purpose to minimize or eliminate the damage caused by the oil and its derivatives. In this sense, the study of the indigenous microorganisms in petroleum-polluted areas allows the selection of potential oil-degrading organisms, producing compounds with biotechnological applications for the petrochemical industry. For instance, the biosurfactants are used widely in the petroleum bioremediation, due to their biodegradability and absence of toxicity. However, knowing that just a small fraction of the microbial species can be isolated and characterized by traditional methods of *in vitro* cultivation, the development of molecular techniques for nucleic acids analyses has allowed a more reliable study of the ecology and microbial diversity in environmental samples. This work had the objectives of (i) isolation of microorganisms present in landfarm soil of the Landulpho Alves refinery (São Francisco do Conde / BA), capable to use petroleum as the unique carbon source; (ii) production of compounds with surfactant activity, assessing their potential applicability in the petrochemical industry; and (iii) standardization of a simple methodology for total DNA extraction from microorganisms present in landfarm soil for further molecular studies of the microbial diversity.

Soil samples from the landfarm were collected in aluminum flasks and transported to the Laboratorio de Monitoramento Ambiental of the Universidade Estadual de Santa Cruz for processing. As negative control, soil samples from the Atlantic Rainforest were used. For the microbial isolation, the samples from both soil types were incubated separately in phosphate buffer under constant agitation of 200 rpm, during 21 days, at room temperature. At the days 0, 3, 7, 14 and 21, aliquots of 1mL of soil suspension were collected and 10-fold serial dilutions were poured onto Petri-dishes containing rich medium (to count the total viable bacteria) and degradation medium containing 2% of crude petroleum as the unique carbon source. The microorganisms isolated from this degradation medium were selected for surfactant compound production by the qualitative drop-collapse technique in different kinds of oils. With the purpose of relating the surfactant activity with the microbial growth, the growth curve of the isolates was determined. The surfactant activity quantification was also determined by dilutions of the supernatants from the microbial cultures to find the maximal dilution yet capable to emulsify the petroleum drop by the drop-collapse technique.

The DNA extraction protocol for the total microbial community from the landfarm soil was standardized using a direct lysis method by maceration with N₂; the DNA extraction was performed with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1). The efficiency of the extraction protocol was confirmed through the PCR amplification using primers for the 16S rRNA gene.

A total of 60 microbial strains capable to use petroleum as the unique carbon source was isolated from the landfarm soil. The maximum growth of the total

heterotrophics (10^{11} cfu.mL⁻¹) occurred in the seventh day of incubation in phosphate buffer, in both soil types, and decreased after this period. The growth of the microbes from the contaminated soil in degradation medium was high, and the maximal value occurred at the 14th day of incubation. The microorganisms from the non-contaminated soil were not capable to growth in the degradation medium, demonstrating that petroleum worked as a selector agent, such just the adapted indigenous microorganisms from the landfarm can develop and, probably, have biodegradation activity. Of these 60 strains, 11 were selected on the basis of their surfactant activities in different types of oils (mineral oil, petroleum, diesel fuel, soy oil and olive oil). The microbial growth curves showed four different patterns among these 11 isolates. For all of them, however, the beginning of surfactant activity detection happened during the declining stage, between 90 and 96 hours of growth; a second stationary stage, with duration of approximately 24 h, was observed immediately after the beginning of the surfactant activity. This momentary interruption of the decline tendency after the surfactant activity detection suggests that the surfactant compounds produced and secreted by the cells cause a change in the nutritional condition of the medium, turning other sources of carbon available for the cellular growth. Regarding the quantification of the surfactant activity, it was possible to observe reproducible differences among the isolates. In general, there was no direct association between higher surfactant activities and higher production of microbial biomass. The 11 isolates selected in this work presented differences amongst themselves in terms of the morphology of their colonies, coloration of the supernatant, growth pattern and surfactant activity.

In this work, we suggested a simple protocol for microbial DNA extraction by a direct lysis method with liquid N₂. This method demonstrated to be efficient for landfarm soil, as it generated high molecular weight products that indicate the presence of many organisms. However, other organics are also extracted by direct lysis, such as the humic and fulvic acids. Since these contaminants can disturb the Taq DNA polymerase activity, a purification step is necessary. No protocol of DNA extraction for studies of autochthonous microorganisms in environmental samples is universally applicable; every type of sample, because of its own nature, requires optimization of specific methods that allow the extraction of large amounts of high quality DNA for further molecular analyses.

The landfarm soil is comprised by a microbial diversity adapted to petroleum that is extremely important for the biodegradation process. The study of the autochthonous microbial diversity becomes fundamental for the understanding of the roles of these microorganisms in polluted environments and for the knowledge of their interactions with the remaining biodiversity inhabitants. Autochthonous microorganisms, producing surfactant compounds, as well as all those (culturable and non-culturable) participants of the microbial consortium, need to be studied with the objective of addressing and to optimizing bioremediation strategies for polluted areas.

KEY WORDS: Biosurfactants, microbial diversity, petroleum biodegradation, bioremediation, landfarm, petrochemical.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

1.	Modelo esquemático da formação do agregado micelar	7
2.	Estrutura química e alguns biossurfactantes	8
3.	Biossíntese do ramnolipídio por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
4.	Representação esquemática dos genes requeridos para a produção da ramnosiltransferase I em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por dois sistemas <i>quorum sensing las</i> e <i>rhl</i>	15
5.	Estrutura química dos autoindutores codificados C ₄ -HSL, N-hexanoil-hemoserina lactona e 3O-C ₁₂ -HSL.....	16
6.	Controle negativo sobre os sistemas <i>quorum sensing las</i> e <i>rhl</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pelas proteínas RpoS, DksA, RsmA e MvaT ..	19
7.	Ilustração esquemática relacionando a curva de crescimento microbiano com a produção de ramnolipídio em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
8.	Representação esquemática dos genes requeridos para a produção de surfactina em <i>Bacillus subtilis</i> por dois sistemas <i>quorum sensing</i>	23
9.	Ilustração esquemática de dois diferentes tipos de cinética de crescimento para a produção de biossurfactante	25
10.	Assimilação da amônia em bactérias	28
11.	Estrutura do rRNA 16S de <i>Escherichia coli</i> e do rRNA 18S de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
12.	Estrutura do <i>cluster</i> gênico que codifica o rRNA em eucariotos e em bactérias	39

CAPÍTULO I

1. Comparative analysis of the indigenous microbial community in soils from disturbed and undisturbed environments 62
2. Typical results obtained for drop-collapse method in two types of oil ... 63
3. Kinetics of microbial growth and surfactant activity for 11 petroleum-grown isolates 64

CAPÍTULO II

1. DNA extracted from landfarm soil contaminated with petroleum waste after electrophoresis on 1.2% agarose gel 73
2. PCR amplification products targeting the 16S rRNA gene in soil DNA 74

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

1.	Propriedades químicas e físicas, e origem microbiana das principais classes de biossurfactantes	9
2.	Principais funções fisiológicas dos biossurfactantes	30
3.	Aplicações terapêuticas dos biossurfactantes	30
4.	Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes	31
5.	Principais tratamentos e suas funções na extração do DNA microbiano total e solo para o estudo a diversidade microbiana	35

CAPÍTULO I

1.	Estimation of the petroleum-related surfactant activity for the 11 landfarm-soil isolates	65
2.	Summarized characterization of the 11 landfarm-soil isolates	66

LISTA DE ABREVIATURAS

CMC	<i>Concentração micelar crítica</i>
mN/m	Mili Newton por metro
TDP-ramnose	Timidina-difosfo ramnose
PAI-1	Peptídeo auto-indutor-1
PAI-2	Peptídeo auto-indutor-2
C ₄ -HSL	<i>N</i> -butanoil-L-hemoserina-lactona
3O-C ₁₂ -HSL	<i>N</i> -(3-oxododecanoil)-L-hemoserina lactona
CSF	Fator estimulador da competência
ORF	<i>Open reading frame</i>
HPA	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
GDH	Glutamato desidrogenase
GS	Sintetase da glutamina
GOGAT	Sintetase do glutamato
MEOR	Recuperação avançada de petróleo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
DGGE	Eletroforese em gradiente de desnaturação
ITS	Espaçadores internos transcritos
rRNA	RNA ribossomal
rDNA	Gene que codifica o rRNA

ÍNDICE

Agradecimentos	iv
Extrato	vi
Abstract	ix
Lista de figuras	xii
Lista de tabelas	xiv
Lista de abreviaturas	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Biorremediação de petróleo	3
2.1.1. Importância da biorremediação nas indústrias petroquímicas	5
2.2. Biossurfactantes	6
2.2.1. Composição química e origem microbiana dos biossurfactantes	8
2.2.2. Seleção de microrganismos potenciais produtores de biossurfactantes	10
2.2.3. Genética molecular da produção dos biossurfactantes	11
2.2.3.1. Genética molecular da síntese de ramnolipídio por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
2.2.3.2. Genética molecular da síntese de lipopeptídeo por <i>Bacillus subtilis</i>	21
2.2.4. Cinética do crescimento microbiano relacionada à produção de biossurfactante	25
2.2.4.1. Fatores nutricionais.....	26

2.2.4.2. Fatores ambientais	28
2.2.5. Função fisiológica dos biossurfactantes	29
2.2.6. Potenciais aplicações industriais dos biossurfactantes	30
2.2.7. O papel dos biossurfactantes na biorremediação	31
2.2.8. Viabilidade econômica no uso de biossurfactantes	32
2.3. Diversidade microbiana	32
2.3.1 Extração do DNA total de solo.....	34
2.3.2. Análise dos genes que codificam o rRNA no estudo da filogenia e diversidade microbiana	37
2.3.3. Estudo da diversidade microbiana através da técnica de DGGE	40

CAPÍTULO I

Differential surfactant activities of microorganisms isolated from a petrochemical landfarm of humid tropical climate in the northeast region of Brazil	43
Abstract	44
Introduction	45
Materials and methods	47
Results	50
Discussion	54
Acknowledgements	59
References	59

CAPÍTULO II

Simple DNA extraction protocol from Brazilian landfarm soil and PCR-based detection of the 16S rRNA gene	67
Carta de confirmação de recebimento do artigo	68
References	72

CONCLUSÕES	75
PERSPECTIVAS	76
REFERÊNCIAS	77

1. INTRODUÇÃO

Anualmente, milhões de toneladas de resíduos de diversas naturezas são produzidos pelas indústrias e acumulados no meio ambiente, constituindo-se uma grande ameaça para a qualidade de vida da população mundial. As indústrias petroquímicas, por exemplo, em suas atividades de exploração, produção, refino, transporte e comercialização de petróleo e derivados, geram resíduos tóxicos ao ambiente que necessitam de tratamento. Além disto, vazamentos acidentais de petróleo decorrentes destas atividades são freqüentemente noticiados em todo mundo, com conseqüências catastróficas ao ambiente e à população.

Os microrganismos apresentam uma incrível versatilidade metabólica e diversidade genética que os tornam amplamente distribuídos na natureza, incluindo os ambientes mais hostis. A capacidade de certos microrganismos utilizarem hidrocarbonetos como fonte de carbono tem sido amplamente explorada em processos de biorremediação de petróleo e seus derivados. A biorremediação permite recuperar os locais contaminados pelo óleo, através da estimulação dos microrganismos naturais que possuem capacidade degradativa, transformando o poluente em compostos menos tóxicos.

O estudo da microbiota presente naturalmente em áreas contaminadas por petróleo permite a seleção de microrganismos potenciais degradadores, produtores de compostos com aplicações biotecnológicas na indústria petroquímica. Os biossurfactantes, por exemplo, são utilizados na recuperação avançada de petróleo, na limpeza de tanques, na dispersão de manchas de óleo, na biorremediação de ambientes contaminados com compostos hidrofóbicos e em diversos outros campos. A preocupação atual com o meio ambiente tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas em biossurfactantes, pois, comparativamente aos surfactantes químicos,

apresentam maior nível de aceitação em decorrência de sua maior biodegradabilidade e ausência de toxicidade.

Nenhuma espécie microbiana, no entanto, é capaz de degradar sozinha todos os componentes do petróleo, necessitando, para isso, de um consórcio entre cepas e espécies. O estudo da diversidade microbiana autóctone torna-se fundamental para a compreensão das funções exercidas pelos microrganismos em locais contaminados e para o conhecimento das suas interações com o ambiente. Sabendo que apenas uma pequena fração das espécies microbianas pode ser isolada e caracterizada pelos métodos tradicionais de cultivo, o desenvolvimento de técnicas moleculares para a análise dos ácidos nucléicos tem permitido um estudo mais fidedigno da ecologia e diversidade microbiana em amostras ambientais.

O estudo de microrganismos potencialmente exploráveis em processos biotecnológicos pode gerar benefícios econômicos e estratégicos em diversas áreas. Na área ambiental, pesquisas precisam ser direcionadas no aprimoramento dos métodos de biorremediação, a partir do estudo da microbiota presente em áreas degradadas. Para tanto, este trabalho teve como objetivos (i) o isolamento de microrganismos presentes em solo de *landfarm* da refinaria Landulpho Alves (São Francisco do Conde / BA), capazes de utilizar petróleo como única fonte de carbono, (ii) a produção de compostos com atividade surfactante, estudando sua potencial aplicabilidade na indústria petroquímica, e (iii) a padronização de uma metodologia simples para a extração do DNA microbiano total do solo de *landfarm*, para estudos futuros da caracterização molecular da diversidade microbiana.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biorremediação de petróleo

A poluição causada por acidentes de derramamento de óleo tem se tornado cada vez mais freqüente, causando catástrofes ecológicas e sociais. Ambientes contaminados incluem solos superficiais ou subsolos, lençóis freáticos, rios, lagos e oceanos. Muitos destes ambientes contêm uma mistura complexa de contaminantes, incluindo produtos da indústria petroquímica (BURGER, 1993; BURNS et al., 1993).

O petróleo é uma mistura bastante complexa de hidrocarbonetos alifáticos, alicíclicos, aromáticos e, em proporções menores, de compostos não hidrocarbônicos, como os ácidos naftênicos e sulfurados. A susceptibilidade desses compostos a biodegradação varia com a concentração, tamanho e estrutura da molécula. (CHOSSON et al., 1991). A utilização de alcanos na faixa de C₅ a C₉ são tóxicos a muitos microrganismos, devido ao seu efeito solvente, pois tendem a romper a estrutura lipídica da membrana dos microrganismos (SEABRA, 2001). O aumento e a ramificação da cadeia dificulta a utilização dos alcanos como fonte de carbono, reduzindo a taxa de biodegradação (ROSATO, 1997).

Pesquisas desenvolvidas na década de quarenta evidenciaram que os microrganismos têm a habilidade de utilizar o petróleo e suas frações como fonte de carbono e energia, e que esses microrganismos estão distribuídos nos mais diversos ecossistemas da natureza. A importância das populações microbianas presentes no solo na degradação de poluentes é bastante conhecida (LEAHY, 1990). Os hidrocarbonetos presentes em uma mistura complexa como o petróleo são, em sua maioria, biodegradados por culturas microbianas mistas, atuando em conjunto de maneira simultânea, mas a diferentes taxas (ALEXANDER, 1981; SEABRA, 2001).

Diante disso, a biorremediação entra como uma alternativa que envolve o processo de aceleração natural da biodegradação. As técnicas de biorremediação podem ser executadas tanto *in-situ* como *ex-situ*. Nos processos *in-situ*, a remediação biológica é feita no próprio local de contaminação. Já nos processos *ex-situ*, o meio contaminado é extraído e tratado em instalações de depuração específica (SEABRA, 2001). Usualmente, as técnicas de biorremediação consistem na bioestimulação, ou seja, na adição de nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo) e ajuste das condições ambientais (pH, temperatura, umidade, aeração, etc.), favorecendo o desenvolvimento da microbiota autóctone. Ou ainda, pela adição de microrganismos com a capacidade de degradar os contaminantes específicos rapidamente, técnica conhecida como bioaugmentação (RON; ROSENBERG, 2002; SEABRA, 2001). Assim, pode-se definir biorremediação como um processo que explora a diversidade e versatilidade metabólica dos microrganismos na transformação dos contaminantes químicos em produtos menos tóxicos. Ainda deve oferecer vantagens significativas sobre outros métodos de tratamento, uma vez que os custos devem ser reduzidos e a poluição local deve ser mínima (TORSVIK et al.,1990).

Os microrganismos responsáveis pela degradação do petróleo produzem uma série de produtos aplicáveis na indústria. Os biossurfactantes, por exemplo, são compostos com propriedades tenso-ativas sintetizados por diversos microrganismos. São utilizados na recuperação avançada de petróleo, na limpeza de tanques, na dispersão de manchas de óleo, na biorremediação de ambientes contaminados com compostos hidrofóbicos e em diversos outros campos. Estes compostos são liberados espontaneamente e são sintetizados predominantemente por microrganismos degradadores de hidrocarbonetos. Ao contrário dos surfactantes quimicamente produzidos, os biossurfactantes são biodegradáveis e inócuos ao ambiente (COOPER, 1986; ROSENBERG, 1986; FIECHTER, 1992).

2.1.1. Importância da biorremediação nas indústrias petroquímicas

A indústria petroquímica, em suas diversas atividades, produz grandes quantidades de resíduos derivados de petróleo que causam problemas de poluição, caso sejam liberados ao ambiente (GAYLARDE, 1996). Dentre os vários métodos de tratamento destes resíduos, o *landfarm* é o mais amplamente utilizado, por possibilitar a transformação dos poluentes em produtos menos tóxicos ao homem e ao ambiente. O *landfarm* consiste no tratamento *ex-situ* dos resíduos de borras oleosas, através da biodegradação por microrganismos autóctones presentes em um determinado solo. Inicialmente, solo é distribuído sobre uma extensa área de superfície plana, previamente coberta por uma lona impermeável. Em seguida, os resíduos de petróleo são aplicados sobre esta grande extensão de solo para serem biodegradados. O solo é periodicamente aerado através de aragem e enriquecido com nutrientes para o desenvolvimento dos microrganismos autóctones, favorecendo o processo de biodegradação (AUSMA et al., 2003; SEABRA, 2001). Este solo é tratado até as concentrações dos contaminantes estarem abaixo dos limites estabelecidos como seguros ou aceitos pelas agências de controle ambiental. Portanto, o solo de *landfarm* é um ambiente rico em microrganismos com atividade degradadora, produtora de compostos metabólicos importantes no processo de biodegradação, como os biossurfactantes (RON; ROSENBERG, 2002; SEABRA, 2001).

O estudo da diversidade microbiana presente no *landfarm* é fundamental para o entendimento do processo de biorremediação do petróleo e seus derivados. Sabendo que apenas aproximadamente 10% da microbiota total presente no solo pode ser isolada e cultivada (GIOVANNONI et al., 1990; TORSVIK et al., 1990), a caracterização da diversidade microbiana através de métodos moleculares torna-se essencial no estudo dos microrganismos não-cultiváveis, participantes do consórcio microbiano responsável pelo processo de biodegradação. No entanto, o estudo dos microrganismos cultiváveis permite o isolamento de potenciais produtores de biossurfactantes, sendo um processo extremamente bem visto ambientalmente e bastante aplicável nas indústrias de petróleo. Os biossurfactantes são utilizados pelas indústrias petroquímicas com objetivo de acelerar o processo de biorremediação e na recuperação avançada de petróleo (MEOR¹).

2.2. Biosurfactantes

Os surfactantes são moléculas anfipáticas², constituídas por uma cadeia de hidrocarbonetos associada a um grupo iônico (aniônico ou catiônico) ou anfotérico³. Os hidrocarbonetos constituem a porção apolar da molécula, enquanto que o grupamento iônico ou anfotérico a porção polar da molécula (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Em função da presença dos grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, os surfactantes possuem características tenso-ativas, ou seja, são capazes de se associar espontaneamente entre as interfaces líquidas (óleo/água e água/óleo) com diferentes graus de polaridade. Com isso, geram redução na tensão superficial e interfacial, e formação de grandes agregados moleculares, denominados micelas (Figura 1). Estas propriedades conferem aos surfactantes características de detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases (DESAI; BANAT, 1997; MANIASSO, 2001). A formação das micelas está associada à concentração micelar crítica (CMC) do surfactante. Abaixo de sua CMC o surfactante está predominantemente na forma de monômeros e, à medida que se aproxima da CMC, ocorre um equilíbrio dinâmico formando as micelas (Figura 1), que representam a associação de 30 a 200 monômeros (MANIASSO, 2001). A CMC depende da estrutura do surfactante e é comumente medida para avaliar a eficiência de um tenso-ativo na solubilização entre as fases aquosas (DESAI; BANAT, 1997).

¹ Consiste em uma técnica de recuperação avançada de petróleo que utiliza microrganismos ou produtos de seu metabolismo para a recuperação de óleo residual (NITSCHKE, PASTORE, 2002).

² Moléculas que possuem tanto grupamentos polares, hidrofílicos, quanto apolares, hidrofóbicos (CAMPBELL, 2000).

³ Possui ambos grupos aniônicos e catiônicos no em meio hidrofóbico (MANIASSO, 2001).

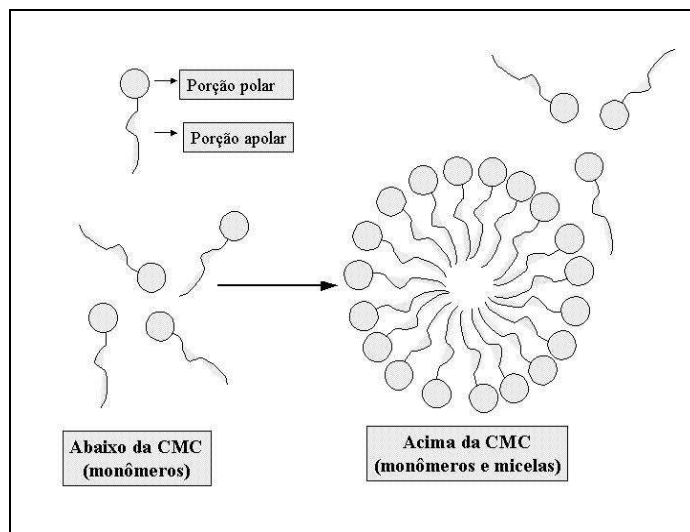


Figura 1 - Modelo esquemático da formação do agregado micelar. Abaixo da concentração micelar crítica (CMC) o surfactante apresenta-se na forma de monômeros (à esquerda) e, à medida que se aproxima da CMC, ocorre a formação de micelas (à direita).

Fonte: (MANIASSO, 2001).

Compostos com propriedades tenso-ativas sintetizados por microrganismos são denominados biossurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Por possuírem significativas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, além de uma vasta potencialidade de aplicações, os biossurfactantes têm sido amplamente estudados e utilizados nas indústrias petroquímica e alimentícia, como aditivos de cosméticos, no controle biológico, na medicina terapêutica, na biorremediação e em diversas outras aplicações (BANAT et al., 2000; DESAI; BANAT, 1997; KARANTH et al., 1999; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; NITSCHKE; PASTORE, 2002; RON; ROSENBERG, 2001). Dentre estas vantagens, destacam-se baixa toxicidade, alta degradabilidade, tolerância à temperatura, pH e salinidade, alta atividade espumante, excelente atividade superficial e interfacial (diminuem a tensão superficial em menores concentrações), ser produzido a partir de substratos renováveis e capacidade de modificação estrutural através da engenharia genética ou técnicas bioquímicas. Além disto, os biossurfactantes possuem grande diversidade química e propriedades físicas distintas, possibilitando aplicações mais específicas (DESAI; BANAT, 1997; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

2.2.1. Composição química e origem microbiana dos biossurfactantes

A porção apolar da molécula de biossurfactante é composta por ácidos graxos (saturados ou insaturados) e a porção polar consiste de mono-, di-, ou polissacarídeos, aminoácidos ou peptídeos cíclicos (aniônicos ou catiônicos), ácido carboxílico, fosfato ou álcool. As principais classes incluem glicolipídeos (Figura 2A, B, C), lipopeptídeos e lipoproteínas (Figura 2D), fosfolipídeos e ácidos graxos (Figura 2E), surfactantes poliméricos (Figura 2F) e surfactantes particulados (DESAI; BANAT, 1997). A classificação dos biossurfactantes é feita de acordo com sua composição química, propriedades e origem microbiana. Como demonstrada na Tabela 1, os microrganismos produtores de biossurfactantes estão distribuídos em uma grande variedade de gêneros, tanto fungos quanto bactérias.

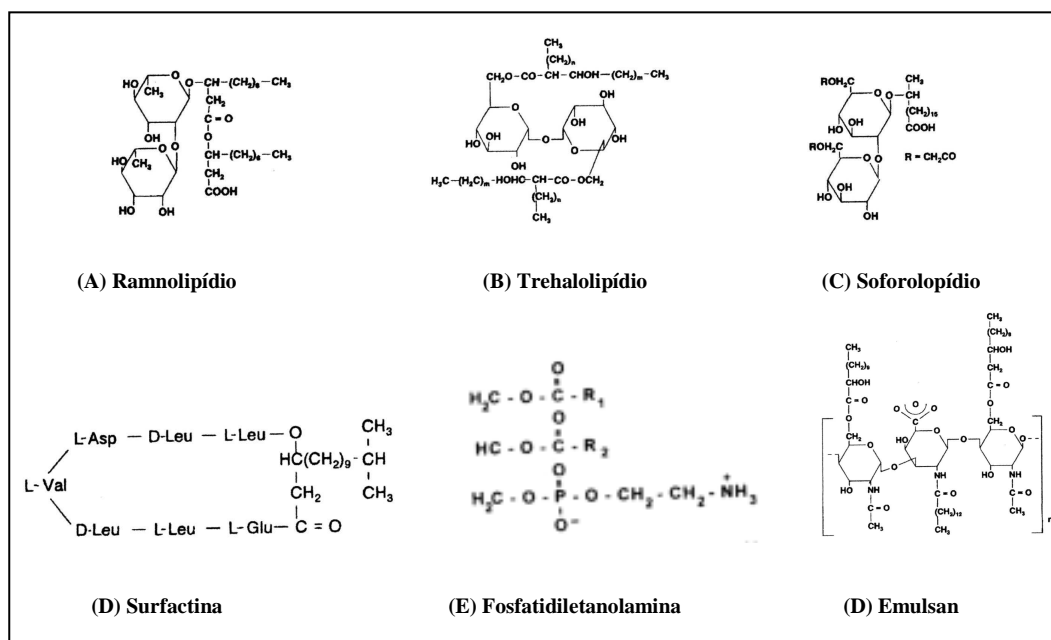


Figura 2 – Estrutura química de alguns biossurfactantes.

Fonte: (DASAI; BANAT, 1997).

Tabela 1 - Propriedades químicas e físicas, e origem microbiana das principais classes de biossurfactantes

Biossurfactante	Composição química	Microrganismo*	Tensão Superficial (mN/m)	CMC (mg/L)	Tensão Interfacial (mN/m)
1. Glicolipídeos					
– Ramnolipídio	Duas moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico	<i>Pseudomonas</i> sp <i>P. aeruginosa</i>	29 25-30	- 0,1-10	0,25 1
– Trehalolipídio	Trehalose ligada a duas cadeias de ácido mucólico	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Mycobacterium</i> sp <i>Corynebacterium</i> sp <i>Arthrobacter</i> sp	32-36 - - - -	4 20 0,3 - -	14-17 3,5 15 - -
– Soforolipídio	Soforose ligada a uma longa cadeia (C ₁₈) de ácido graxo	<i>Candida bombicola</i> <i>C. apicola</i> <i>Candida</i> sp	33 30 -	- - -	1,8 0,9 -
2. Lipopeptídeos e lipoproteínas					
– Lichenisina	Ácido graxo ligado a aminoácidos	<i>Bacillus licheniformis</i>	27	12-20	0,1-0,3
– Viscosina		<i>P. fluorescens</i>	-	-	-
– Serrawetina		<i>Serratia marcescens</i>	26,5	150	-
– Surfactina →	Lipopeptídeos →	<i>B. subtilis</i>	28-33	-	-
– Subtilisina	cíclicos	<i>B. subtilis</i>	27-32	23-160	1
– Estreptofactina		<i>Streptomyces tendae</i>	-	-	-
– Gramicidina		<i>B. brevis</i>	-	-	-
– Polimixina		<i>B. polymyxa</i>	-	-	-
3. Ác. Graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos					
– Ácidos graxos		<i>Corynebacterium lepus</i>	30	150	2
– Lipídeos neutros		<i>N. erythropolis</i>	32	-	3
– Fosfolipídeos	Fosfatidiletanolamina	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> ; <i>Acinetobacter</i> sp; <i>Aspergillus</i> sp; <i>R. erythropolis</i>	- - -	- - -	- - -
4. Surfactantes poliméricos					
– Emulsan		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	-	-
– Biodispersan		<i>Candida lipolytica</i>	-	-	-
– Liposan	Heterossacarídios	<i>P. fluorescens</i>	-	-	-
– Carboidrato-lipídio-proteína	poliméricos contendo proteínas	<i>Candida tropicalis</i>	-	-	-
– Manana-lipídio-proteína			27	10	-
5. Surfactantes particulados					
– Vesículas		<i>A. calcoaceticus</i>	-	-	-
– Células		Diversas bactérias	-	-	-

* Notar que o mesmo microrganismo (p. ex., *Rhodococcus erythropolis*; *P. fluorescens*; *Nocardia erythropolis*; *B. subtilis* e *Acinetobacter calcoaceticus*) pode produzir diferentes tipos de biossurfactantes.

Fonte: (DESAI; BANAT, 1997 - modificado).

2.2.2. Seleção de microrganismos potenciais produtores de biossurfactantes

O crescente interesse industrial pela produção de surfactantes microbianos tem motivado muitos pesquisadores para o estudo e desenvolvimento de métodos rápidos e seguros na seleção de microrganismos produtores de biossurfactantes. Dentre estes métodos, o teste do colapso da gota (JAIN et al., 1991) merece uma atenção especial por se tratar de uma técnica rápida, prática e reproduzível. Recentemente, Youssef et al. (2004), compararam diferentes métodos de detecção de microrganismos potenciais produtores de biossurfactantes e o teste do colapso da gota demonstrou ser um método confiável na seleção destes microrganismos. Neste método, uma pequena quantidade de água aplicada sobre um composto hidrofóbico, na ausência de surfactantes, formará uma gota, pois a molécula polar da água é repelida pela superfície hidrofóbica. No entanto, se for aplicado um surfactante a esta suspensão, a tensão interfacial é reduzida, resultando na dispersão (colapso) da gota de água na superfície hidrofóbica. Baseado neste princípio, o teste do colapso da gota é utilizado na seleção de microrganismos potenciais produtores de biossurfactantes (BOUDOURE; MILLER-MAIER, 1998).

A atividade quantitativa dos biossurfactantes é comumente determinada através da medida da mudança nas tensões superficiais e interfaciais por um tensiômetro, e cálculo da CMC que é uma medida de sua eficiência. Ao medir-se a tensão superficial da água destilada, encontra-se um valor de 72 mN/m, mas a adição de surfactante diminui este valor a 30 mN/m (DESAI; BANAT, 1997); este é apenas um exemplo da atividade tenso-ativa de um biossurfactante. A maioria dos biossurfactantes apresenta uma tensão superficial em torno de 30 mN/m, enquanto que a tensão interfacial fica ao redor de 1 mN/m (NITSCHKE; PASTORE, 2002). O cálculo da CMC dos biossurfactantes é realizado através de diluição seriada e medida da tensão superficial em cada diluição. Quando a CMC é atingida, o valor da tensão superficial permanece o mesmo. Assim, a CMC da maioria dos biossurfactantes varia entre 1-2000 mg/L (DESAI; BANAT, 1997; NITSCHKE; PASTORE, 2002). Os valores da tensão

superficial, tensão interfacial e CMC de alguns biossurfactantes conhecidos estão listados na Tabela 1.

Boudour e Miller-Maier (1998) desenvolveram uma metodologia modificada do teste do colapso da gota para análise quantitativa de biossurfactantes. Nesta técnica, uma curva de concentração padrão para cada surfactante deve ser calculada inicialmente. Adicionam-se gotas de um surfactante conhecido em diversas concentrações sobre uma superfície sólida e plana. Após um minuto, o diâmetro de cada gota é medido e uma curva padrão é calculada através da concentração do surfactante (eixo X) versus o diâmetro a gota (eixo Y). Conforme a concentração aumenta, o diâmetro da gota também aumenta até que a CMC seja alcançada, não alterando mais o tamanho da gota. Esta curva é utilizada para determinar a concentração de surfactantes provenientes de amostras não conhecidas através da comparação entre os diâmetros encontrados e os diâmetros das gotas do padrão. Os autores demonstraram que esta metodologia apresentou uma maior sensibilidade e reprodutibilidade em relação à mensuração da tensão superficial.

2.2.3. Genética molecular da produção dos biossurfactantes

Devido à estrutura anfipática da molécula, duas rotas bioquímicas são necessárias para a produção dos biossurfactantes. Uma está relacionada à síntese da porção hidrofóbica e a outra à síntese da porção hidrofílica da molécula, produzindo hidrocarboneto e carboidrato, respectivamente. Diversas são as vias metabólicas para a síntese destes dois grupos de precursores, envolvendo grupos de enzimas específicos. Em muitos casos, as enzimas regulatórias são as primeiras a serem requeridas e, apesar da diversidade entre os biossurfactantes, existem algumas características comuns nestes processos de síntese e de regulação da expressão gênica (DESAI; BANAT, 1997). O estudo da genética molecular da produção de biossurfactante ainda é recente e, portanto, pouco conhecido. Entretanto, os mecanismos genéticos para a regulação e síntese de ramnolipídio por *Pseudomonas aeruginosa* e de surfactina por *Bacillus subtilis*, estão sendo bastante estudados e esclarecidos (SULLIVAN, 1998).

2.2.3.1. Genética molecular da síntese de ramnolipídio por *Pseudomonas aeruginosa*

Os dois principais glicolípídeos produzidos pela *P. aeruginosa* na síntese de ramnolipídio, durante o crescimento em meio de cultura líquido, são ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (mono-ramnolipídio) e ramnosil-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (di-ramnolipídio). A síntese destas moléculas ocorre através de reações de transferências seqüenciais de glicosil, cada uma catalisada por uma ramnosiltransferase específica. Mono-ramnolipídios são sintetizados pela ramnosiltransferase I, sendo a timidina-difosfo-ramnose (TDP-ramnose) a molécula doadora e a β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato atuando como receptora. Di-ramnolipídios são sintetizados pela ramnosiltransferase II, que atua na transferência de uma molécula de difosfo-ramnose ao mono-ramnolipídio, como ilustrado na Figura 3 (BURGER et al., 1963; OCSHSNER et al., 1994).

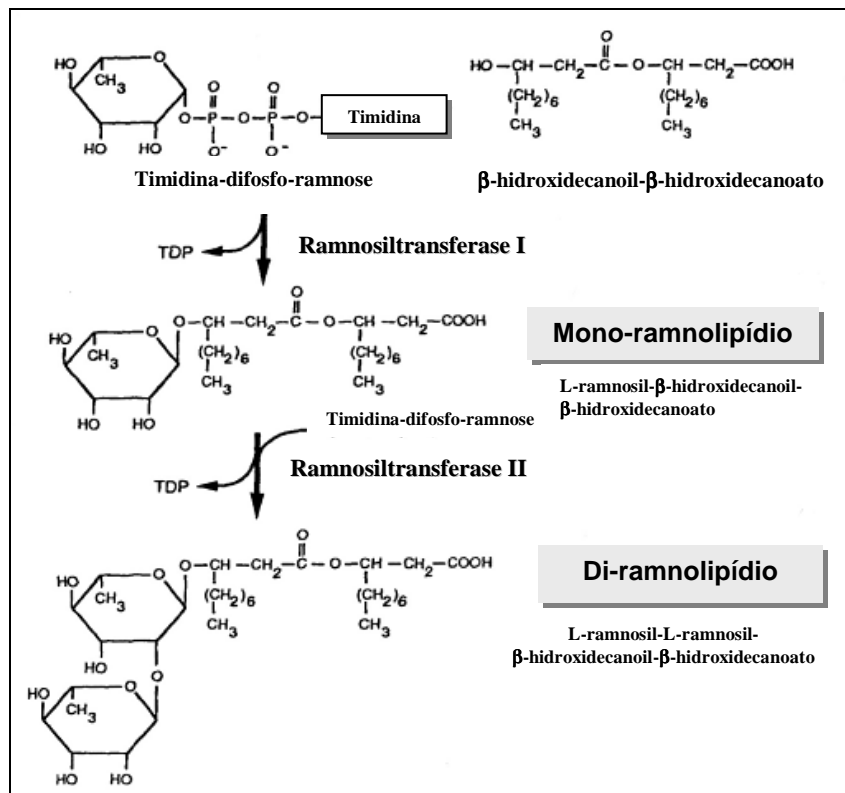


Figura 3 - Biossíntese do ramnolipídio por *Pseudomonas aeruginosa*. Timidina difosfo ramnose (TDP-ramnose) atua como molécula doadora em duas reações seqüências da ramnosiltransferase. Inicialmente, na síntese do mono-ramnolipídido, através da enzima ramnosiltransferase I e em seguida na síntese do di-ramnolipídio, através da enzima ramnosiltransferase II.

Fonte: (OCHSNER et al., 1994, modificado de BURGER et al., 1963).

A organização molecular dos genes requeridos para a produção de ramnolipídios é ilustrada na Figura 4. Quatro genes estão envolvidos na síntese da ramnosiltransferase I, *rhlA*, *rhlB*, *rhlR* e *rhlI*. Os genes estruturais *rhlA* e *rhlB* estão organizados em um operon, e são transcritos em um único RNA (OCHSNER et al., 1994; SULLIVAN, 1998). O gene posterior *rhlB* codifica uma proteína estrutural de 47 kDa localizada na membrana citoplasmática e possui o papel catalítico da ramnosiltransferase, enquanto o gene inicial *rhlA* codifica uma proteína de 32.5 kDa localizada no periplasma e, provavelmente, funciona na síntese, transporte ou estabilização da ramnosiltransferase dentro da membrana citoplasmática (OCHSNER et al., 1994).

A expressão da ramnosiltransferase I é regulada por dois sistemas *quorum sensing* - *rhl* e *las*. Por definição, sistema *quorum sensing* é um mecanismo pelo qual as células bacterianas regulam genes específicos, em resposta a concentrações críticas de moléculas sinais⁴ produzidas conforme o aumento da densidade celular (DIGGLE et al., 2002). O sistema *quorum sensing*, codificado pelos genes *rhlR* e *rhlI*, regula positivamente a expressão de *rhlA* e *rhlB* e está localizado imediatamente *downstream* aos genes estruturais, conforme mostra a Figura 4 (OCSHSNER; REISER, 1995; SULLIVAN, 1998). O gene *rhlR* codifica o ativador transcricional (proteína RhlR) enquanto *rhlI* codifica uma enzima que participa na formação de duas moléculas sinais que funcionam como autoindutor: *N*-butanoil-L-hemoserina-lactona (PAI-2 ou C₄-HSL), como forma dominante, e *N*-hexanoil-L-hemoserina lactona (Figura 4). Estas duas moléculas estão presentes em sobrenadantes de cultura de *P. aeruginosa* em uma relação molar de aproximadamente 15:1 (WINSON et al., 1995). O ativador RhlR associa-se ao autoindutor PAI-2, regulando positivamente a biossíntese de ramnolipídio através de sua ligação na região promotora de *rhlA* e de *rhlI* (SULLIVAN, 1998).

⁴ Moléculas que indicam a resposta da célula às condições do meio (ALBERTS et al., 1997).

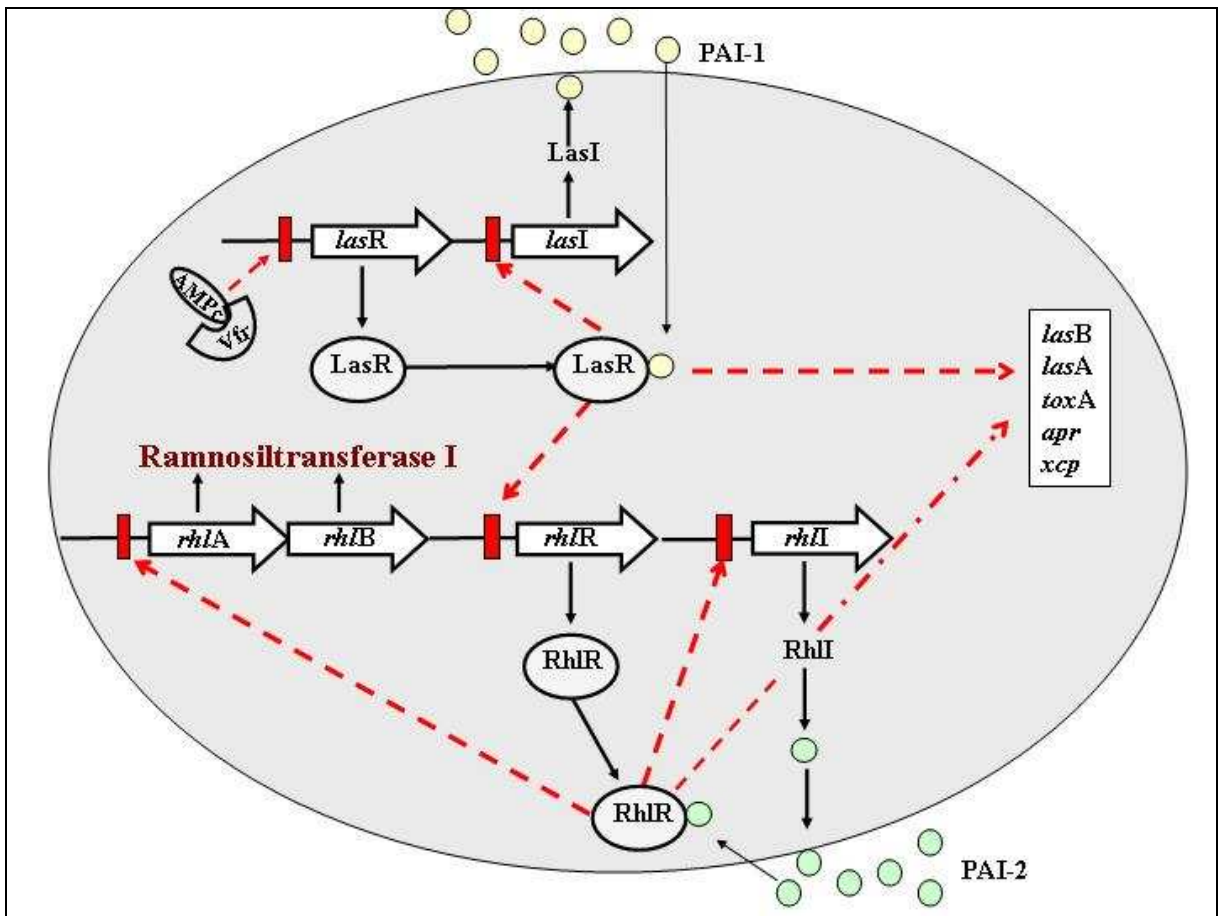


Figura 4 - Representação esquemática dos genes requeridos para a produção da ramnosiltransferase I em *Pseudomonas aeruginosa* por dois sistemas *quorum sensing* hierárquicos *las* e *rhl*: A regulação começa com a ativação da transcrição de *lasR*, pela proteína Vfr (receptor de AMPc), codificando ativador transcricional LasR. Quando a concentração do autoindutor PAI-1 eleva, devido à alta densidade celular, LasR liga-se ao PAI-1, codificado por *lasI*, e regula a transcrição de *rhlR* na região “lux-box” do promotor. RhlR liga-se ao autoindutor correspondente, PAI-2, e interage com a região “lux-box” do promotor *rhlA* para iniciar a transcrição dos genes da ramnosiltransferase I, *rhlAB*. Os sistemas *quorum sensing las* e *rhl* regulam também a expressão de numerosos outros genes (*las B*, *lasA*, *aprA*, *toxA*, *xcp*). As setas largas representam genes no cromossomo de *Pseudomonas*. Os retângulos vermelhos representam seqüências palindrômicas de 20 pares de bases denominação “lux-box” na região promotora. Setas contínuas azuis demonstram a produção proteica por um gene e setas pontilhadas vermelhas demonstram onde o autoindutor, ligado ao seu ativador transcricional correspondente, controla positivamente a expressão gênica.

Fonte: (SULLIVAN, 1998 – modificado).

Um segundo sistema *quorum sensing*, codificado pelos genes *lasR* e *lasI* e encontrado em uma região diferente do cromossomo de *P. aeruginosa* também influencia a expressão da biossíntese de ramnolipídio (SULLIVAN, 1998). O gene *lasR* codifica o ativador transcricional (proteína lasR), enquanto *lasI* codifica o autoindutor *N*-(3-oxododecanoil)-L-hemoserina lactona (PAI-1 ou 3O-C₁₂-HSL), como ilustrado na Figura 4 (PEARSON et al., 1994; SULLIVAN, 1998). A estrutura química dos autoindutores está ilustrada na figura 5. Para iniciar a cascata *quorum*

sensing, LasR e PAI-1 estão em concentrações basais. Conforme a densidade celular vai aumentando, *lasR* é ativado por Vfr (receptor de AMPc), e PAI-1 alcança uma concentração suficiente para ligar-se a LasR (ALBUS, 1997; PESCI, 1997). Assim, em altas densidades celulares, PAI-1 associa-se ao autoindutor *lasR*, regulando positivamente a expressão de *lasI* e *rhIR*. Além disto, Pesci et al. (1997) demonstraram que o sistema *las* exerce um controle pós-transcricional sobre o sistema *rhII*, pois PAI-1 bloqueia PAI-2 de ligar-se a RhlR, até quantidades suficientes de PAI-2 ou RhlR serem produzidas, superando este efeito bloqueador. Portanto, a interação dos dois sistemas *quorum sensing* funciona em cascata, sendo *lasR* e *lasI* considerados como os reguladores mestres (SULLIVAN, 1998).

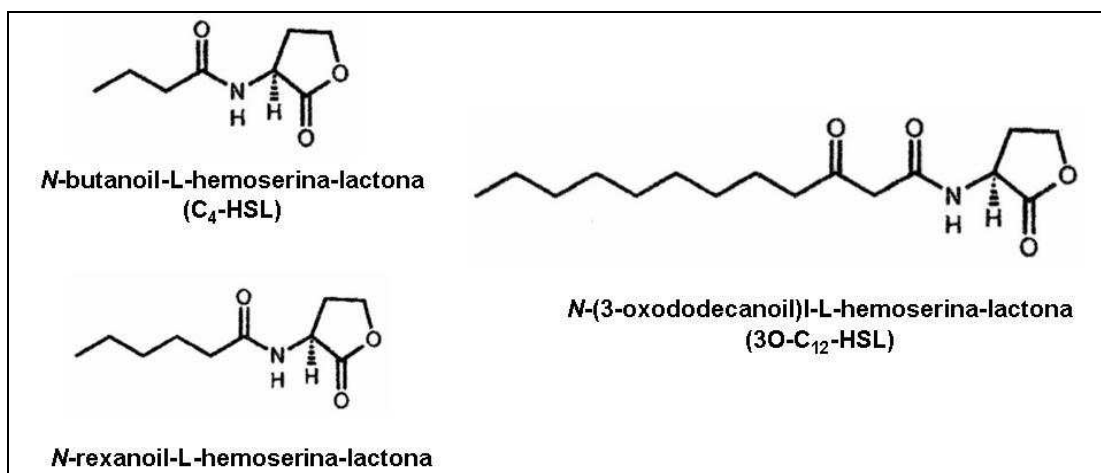


Figura 5 – Estrutura química dos autoindutores C₄-HSL, N-hexanoil-homoserina-lactona e 3O-C₁₂-HSL.

Fonte: (Winson et al., 1995).

Rahim et al (2001) identificaram e caracterizaram pela primeira vez o gene *rhlC*, responsável por codificar a ramnosiltransferase II, a segunda glicosiltransferase envolvida na síntese de ramnolipídio em *P. aeruginosa*. O gene *rhlC* localiza-se em um operon contendo um outro gene *upstream* PA1131, cuja função ainda é desconhecida. A expressão do operon PA1131-*rhlC* demonstrou ser dependente do sistema *quorum sensing rhl* da ramnosiltransferase I e uma região bem conservada “*lux box*” foi identificada na região promotora do operon. Pouco ainda se sabe sobre o funcionamento deste operon.

Resumindo, a primeira etapa da biossíntese do ramnolipídio envolve a produção dos precursores TDP-ramnose e β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato. Em seguida, estes precursores são colocados em contato próximos à membrana citoplasmática através da ramnosiltransferase I para a produção de mono-ramnolipídio. Parte destes mono-ramnolipídios produzidos são secretados diretamente pela célula, enquanto que a outra parte é transformada em di-ramnolipídio pela enzima ramnosiltransferase II sendo secretado para o meio extracelular. O mecanismo de transporte dos ramnolipídios para o meio extracelular ainda não está claro, sendo o produto do gene PA1131 um forte candidato na realização deste transporte, já que a análise de sua seqüência demonstrou 11 domínios transmembranas⁵ (RAHIM et al., 2001).

No que se refere ao controle dos sistemas *quorum sensing* e sua consequência na expressão de fatores de virulência, é interessante constatar que, em muitas bactérias, a expressão de alguns genes de virulência, a produção de antibióticos e outros processos são também controlados pelos produtos desses sistemas de *quorum sensing*. Em *P. aeruginosa*, alguns determinantes de virulência como elastase (*las B*), Las A protease (*lasA*), protease alcalina (*aprA*), exotoxina A (*toxA*), e genes *xcp* requeridos para a secreção proteica, também são regulados positivamente pelos sistemas *las* e *rhl*, como ilustrado na Figura 4 (BRINT et al., 1995; CHAPON-HERVE et al., 1997; PEARSON et al., 1997; PESCI et al., 1997; SULLIVAN, 1998). O estudo destes controladores é de grande relevância para a medicina terapêutica, pois a inibição dos sistemas *quorum sensing* leva a diminuição da síntese de fatores de virulência. Whiteley et al. (1999) identificaram 47 genes controlados pelos sistemas *las* e *rhl*. Estes genes foram agrupados em quatro classes de acordo com o padrão temporal de resposta aos autoindutores durante o crescimento celular. As classes I e III responderam às moléculas sinais imediatamente, enquanto as classes II e IV responderam aos sinais somente na fase estacionária, provavelmente devido a outros mecanismos controladores destes genes, prevenindo sua expressão precoce.

⁵ Porção da proteína com sítios de localização transmembranas (ALBERTS et al., 1997).

Algumas proteínas exercem um efeito negativo inibindo a expressão dos sistemas *quorum sensing las* e *rhl* de *P. aeruginosa* e, conseqüentemente, possuem um importante papel na regulação da produção de fatores de virulência. Dentre elas podemos destacar: RpoS, DksA, QscR, RsmA, e MvaT (BRANNY et al., 2001; CHUGANI et al., 2001; DIGGLE et al., 2002; MEDINA et al., 2003; PESSI et al., 2001; WHITELEY et al., 2000). Recentemente, Pearson (2002) relatou as principais descobertas dos genes controladores do sistema *quorum sensing las* e *rhl* de *P. aeruginosa*. A proteína RpoS está relacionada à resposta ao estresse de algumas bactérias gram-negativas e é induzida enquanto as culturas entram na fase estacionária. A expressão de *rpoS* aumenta a expressão de mais de 35 genes, a maioria envolvida na resposta ao estresse. Entretanto, em *Pseudomonas aeruginosa*, RpoS parece atuar no início da fase exponencial de crescimento, evidenciando o controle negativo de RpoS para o gene *rhlI* nesta fase de crescimento (WHITELEY et al., 2000). Ainda na fase exponencial, a proteína QscR exerce um controle negativo na expressão do gene *lasI* (CHUGANI et al., 2001). Durante a fase estacionária, a proteína DksA atua como responsável pela repressão de *rhlI* (BRANNY et al., 2001). As proteínas RsmA (reguladora de metabólitos secundário) e MvaT exercem um controle pós-transcricional sobre ambos os genes, *lasI* e *rhlI* durante a fase estacionária, causando, conseqüentemente, a diminuição dos autoindutores 3O-C₁₂-HSL (PAI-I) e C₄-HSL (PAI-II), respectivamente (DIGGLE et al., 2002; PESSI et al., 2001). Portanto, os sistemas *quorum sensing las* e *rhl* são controlados negativamente tanto na fase exponencial, através as proteínas RpoS e QscR, quanto na fase estacionária do crescimento de *P. aeruginosa*, pelas proteínas DksA, RsmA e MvaT (Figura 6).

Para ocorrer a produção de ramnolipídio e conseqüente síntese de fatores de virulência, é necessário que a densidade celular esteja alta o suficiente para que os autoindutores produzidos por várias bactérias consigam penetrar nas células e ligarem-se aos seus ativadores transcricionais correspondentes. Com isso, a expressão dos genes *lasI*, *rhlI* e do operon *rhlAB* é aumentada. Portanto, a dose infectante e a colonização microbiana estão estreitamente relacionadas à virulência de patologias causadas por *P. aeruginosa* como, por exemplo, a fibrose cística. Todavia, este

mecanismo não explica a produção de ramnolipídio em ambientes contaminados por hidrocarbonetos, onde a densidade celular é presumidamente baixa, mas a produção de biosurfactante é elevada, o que acelera o processo de degradação. Nestes ambientes, cada célula irá criar seu próprio micro ambiente dentro de cada micela, que estimulará a produção de biosurfactante independente do aumento da densidade celular (SULLIVAN, 1998).

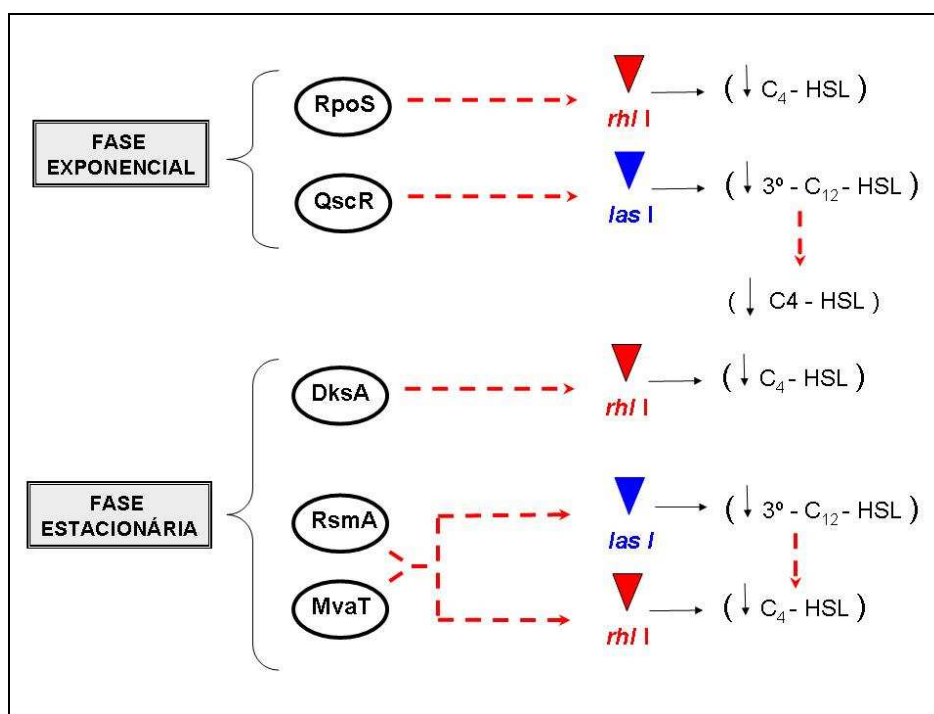


Figura 6 – Controle negativo sobre os sistemas *quorum sensing las* e *rhl* de *Pseudomonas aeruginosa* pelas proteínas RpoS, QscR, DksR, RsmA e MvaT. Os genes *lasI* e *rhlI* são controlados por diferentes proteínas tanto na fase exponencial quanto na fase estacionária do crescimento microbiano. Os triângulos representam a inibição da transcrição do gene.

O aumento dos inibidores dos sistemas *quorum sensing* pode auxiliar no tratamento de doenças causadas por *P. aeruginosa*. Porém, em processo de biodegradação de ambientes contaminados por petróleo e derivados, é interessante que estes controladores sejam inibidos, otimizando, assim, a produção de ramnolipídio. Este é um exemplo simples da versatilidade microbiana em que a produção de um determinado composto (neste caso, ramnolipídio) pode ser indesejada em algumas situações e extremamente necessária para outras aplicações.

Resumindo, o operon *rhlAB*, responsável pela síntese de ramnolipídio em *P. aeruginosa*, é controlado por dois sistemas *quorum sensing*; portanto, para ocorrer a produção do biossurfactante é necessário que a densidade celular esteja elevada. Com isso, a produção de moléculas-sinal torna-se suficiente para ligação aos autoindutores específicos e conseqüente ativação do operon *rhlAB*. Assim, o pico de produção de ramnolipídio ocorre no final da fase estacionária do crescimento microbiano, quando a densidade celular está tão elevada que as proteínas que controlam negativamente os sistemas *quorum sensing* não impedem a transcrição dos genes (Figura 7). Medina et al. (2003) demonstraram que o operon *rhlAB* não é expressado durante a fase logarítmica do crescimento de *P. aeruginosa*, mesmo na presença de seu ativador transcricional (RhlR) e do autoindutor (C₄-HSL), concluindo que deve haver outros elementos regulatórios que previnem a expressão deste operon durante esta fase de crescimento.

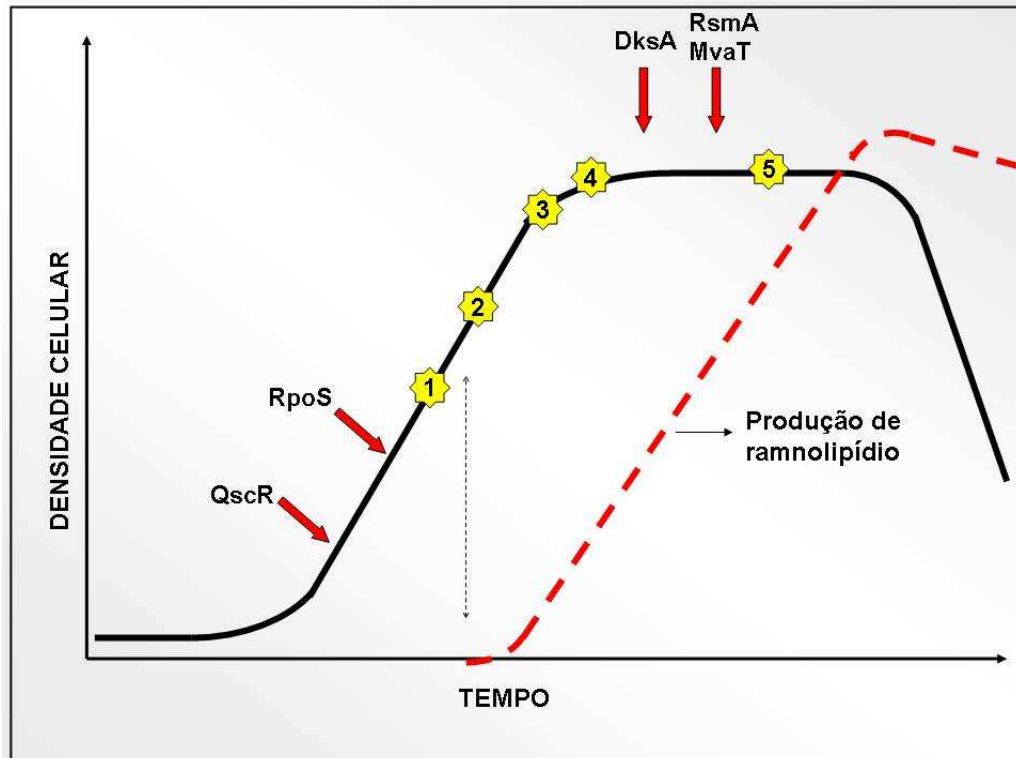


Figura 7 – Ilustração esquemática relacionando a curva de crescimento microbiano (linha contínua) com a produção de ramnolipídio (linha pontilhada) em *Pseudomonas aeruginosa*. No início da fase exponencial, as proteínas QscR e RpoS controlam negativamente a expressão de *lasI* e *rhII*, respectivamente. Conforme a densidade celular vai aumentando, *lasR* (1) é ativado pela proteína Vrf (receptora e AMPc), produzindo o ativador transcricional LasR. Durante a segunda metade da fase exponencial, *lasI* (2) é transcrito, sintetizando o autoindutor 3O-C₁₂-HSL. A produção elevada de LasR e 3O-C₁₂-HSL, conforme o aumento do crescimento microbiano, ativa a expressão de *rhlR* (3) e *rhII* (4), sintetizando o ativador transcricional RhlR e o autoindutor C₄-HSL, respectivamente, no final da fase exponencial. Conseqüentemente, a transcrição do operon *rhlAB* (5), produzindo a ramnosiltransferase I, terá seu máximo durante a fase estacionária, quando a densidade celular está tão elevada que as proteínas DksA, RsmA e MvaT que controlam negativamente os sistemas *quorum sensing*, não impedirão a transcrição dos genes. As estrelas amarelas ilustram o momento aproximado do máximo de expressão dos genes *lasI* (1), *lasR* (2), *rhlR* (3), *rhII* (4), *rhlAB* (5). As setas vermelhas indicam a atuação das proteínas controladoras dos sistemas *quorum sensing* (vide Figura 6).

2.2.3.2. Genética molecular da síntese de lipopeptídeo por *Bacillus subtilis*

Diversos microrganismos produzem peptídeos com atividades biológicas, como antibióticos, inibidores enzimáticos, toxinas e imunossupressores, sendo de grande importância na medicina, agricultura, em pesquisas biológicas e na indústria. Alguns destes peptídeos são sintetizados no ribossomo, porém a maioria é sintetizada bioquimicamente por processos não-tradicionais (não ribossomais), envolvendo

enzimas específicas que catalisam reações de uniões entre moléculas específicas de aminoácido presentes no meio (STACHELHAUS; MARAHIEL, 1995). De um modo geral, estes peptídeos contêm um ácido graxo ligado a aminoácidos que sofrem extensivas modificações pós-transcricionais (STACHELHAUS; MARAHIEL, 1995; DESAI & BANAT, 1997). A molécula de surfactina é composta por um peptídeo cíclico contendo sete aminoácidos (Glu-Leu-D-Leu-Val-Asp-D-Leu-Leu) ligados a uma cadeia de ácido graxo de 13-15 carbonos, sendo o ácido 3-hidroxi-13-metil tetradecanóico o componente mais abundante da molécula (Figura 2D). Este peptídeo é sintetizado pela ação da surfactina peptídeo sintetase, sendo uma aciltransferase requerida no processo inicial de transferência da molécula de ácido graxo ao primeiro aminoácido do peptídeo (SULLIVAN, 1998). Considerando, então, que a surfactina é um peptídeo sintetizado bioquimicamente por um processo não-traducional (RNA-independente), a organização molecular dos genes requeridos para sua produção é ilustrada na Figura 8.

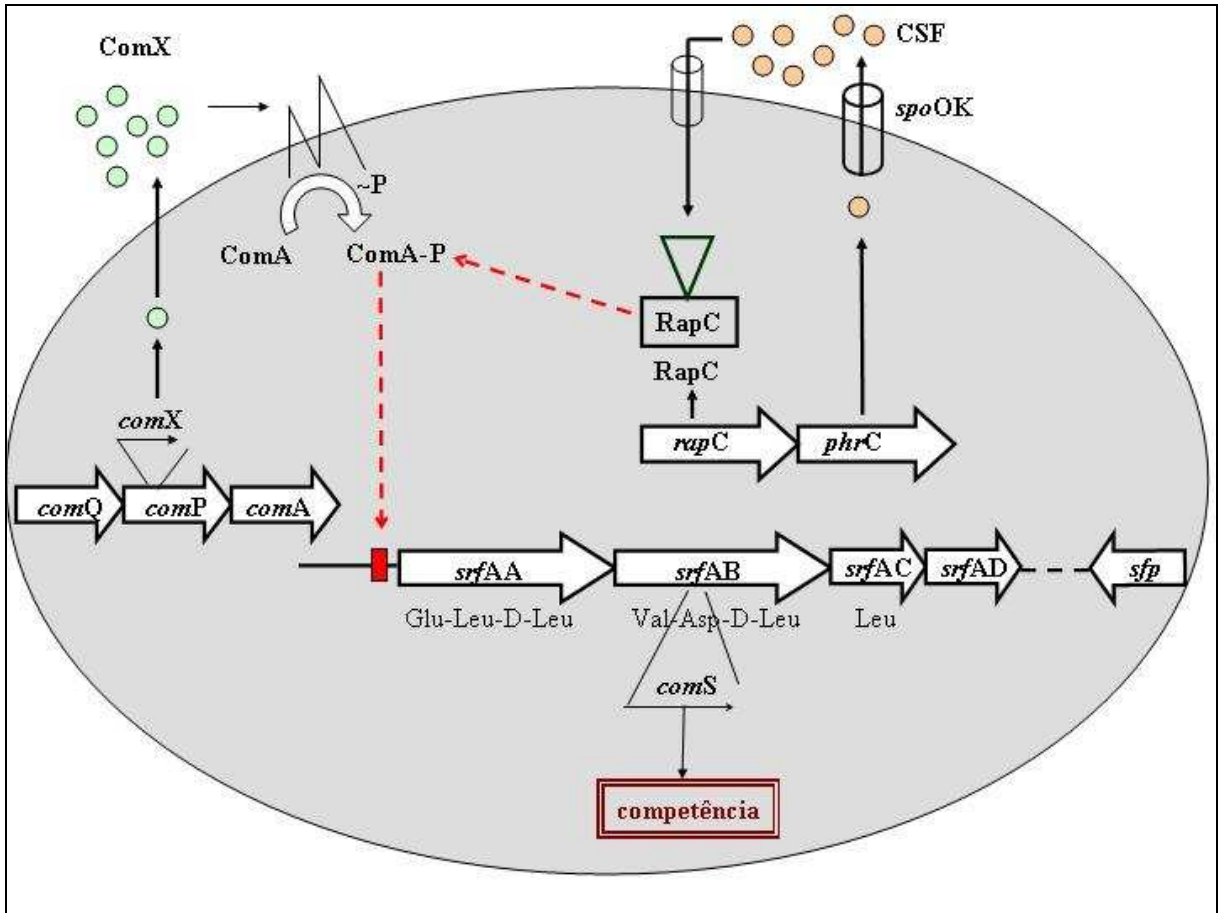


Figura 8 – Representação esquemática dos genes requeridos para a produção de surfactina em *Bacillus subtilis* regulados por dois sistemas *quorum sensing*. A regulação começa com a transcrição de *comX*, e este produto transcrito é modificado pelo produto do gene *comQ*, tornando-se o peptídeo sinal ComX. ComX interage com ComP, uma histidina quinase ligada a membrana, que transfere um grupamento fosfato a ComA. Uma vez fosforilada, ComA liga-se ao promotor do operon *srfA* (*comA*-box), iniciando a transcrição da surfactina peptídeo sintetase e transcrição de *comS*, responsável pelo desenvolvimento da competência celular. O gene *sfp*, localizado *downstream* ao operon *srfA* também é requerido para produção de surfactina. Um segundo sistema *quorum sensing* codificado por *phrC* produz um peptídeo sinal denominado fator estimulador da competência (CSF). CSF é dependente do produto do gene *spoOK* para atravessar a membrana celular. Quando a concentração de CSF cresce dentro da célula, ocorre a inibição da atividade fosfotransferase de RapC aumentando a expressão do operon *srfA*. As setas largas representam genes no cromossomo de *B.subtilis*. Os retângulos amarelos representam as seqüências “*comA*-box” na região promotora de *srfA* para ligação de ComA. A seta larga semicircular ilustra a transferência de um fosfato de uma enzima para outra. Setas contínuas azuis demonstram a produção proteica por um gene e setas pontilhadas vermelhas demonstram a regulação da expressão gênica.

Fonte: (SULLIVAN, 1998 – modificado).

A surfactina peptídeo sintetase possui estrutura modular (em subunidades), sendo codificada por quatro ORFs (*open reading frames*) no operon *srfA* - *srfAA*, *srfAB*, *srfAC*, *srfAD* -, cada uma responsável posteriormente pela adição de um ou mais aminoácidos presentes na molécula do peptídeo, como demonstrado na Figura 8

(SULLIVAN, 1998). Em uma região localizada a 4Kb *downstream* ao operon *srfA*, localiza-se o gene *sfp* (STACHELHAUS; MARAHIEL, 1995), e seu produto é responsável pela ativação da surfactina sintetase através de modificações pós-traducionais (LAMBALOT et al., 1996). Algumas cepas mutantes de *B. subtilis* desprovidas do gene *sfp* (*sfp*⁰), mas contendo o operon *srfA* intacto, demonstraram ser incapazes de produzir surfactina (STACHELHAUS; MARAHIEL, 1995).

Dentro do operon *srfA*, está presente uma ORF contendo o gene *comS* (localizado entre *srfAA* e *srfAB*, Figura 8), também dependente do promotor *srfA* para sua expressão e cujo produto é responsável pelo desenvolvimento da competência celular para processos de transferências genética (D'SOUZA et al., 1994). Esta competência natural corresponde ao estágio fisiológico no qual a célula bacteriana está apta a captar fragmentos de DNA solúveis no meio. Estes fragmentos são introduzidos em regiões homólogas no cromossomo bacteriano que, assim, transforma-se geneticamente (MADIGAN, 2000; SALOMON; GROSSMAN, 1996). Devido a este arranjo genético, a ativação do operon *srfA*, além de ser essencial para a síntese de surfactina, é requerida também para o desenvolvimento da competência celular e eficiência na esporulação (YAKIMOV; GOLYSHIN, 1997; STACHELHAUS; MARAHIEL, 1995). Todo o mecanismo de regulação do operon *srfA* está relacionado a outros fatores envolvidos no desenvolvimento da competência, tais como ComX, ComP, ComA e o fator estimulador da competência, CSF (SULLIVAN, 1998).

Um sistema *quorum sensing* controla a expressão de *srfA* via uma molécula sinal, ComX, que se acumula no meio quando a densidade celular está elevada. ComX interage na membrana celular com duas moléculas-sinal, ComP (histidina quinase ligada à membrana), e ComA (proteína reguladora). Quando fosforilado por ComP, ComA liga-se ao promotor de *srfA*, iniciando a transcrição do operon. O fator estimulador da competência (CSF), sintetizado por um outro sistema *quorum sensing*, também influencia a expressão de *srfA*. CSF é transportado através da membrana por uma oligopeptídeo permease, *spoOK*, e interage com, no mínimo, dois diferentes receptores intracelulares. Em baixas concentrações celulares, CFS estimula a expressão de *srfA* através da inibição da fosfatase RapC, que defosforila ComA. No

entanto, em altas concentrações, CSF inibe a expressão de *srfA* e estimula a esporulação por um mecanismo, ainda desconhecido, independente de RapC. O controle da expressão do operon *srfA* está representado na Figura 8 (SULLIVAN, 1998). Estudos genéticos caracterizando a produção de lichenisina por *B. licheniformis*, demonstraram a similaridade na síntese e regulação de os lipopeptídeos (YAKIMOV; GOLYSHIN, 1997).

2.2.4. Cinética do crescimento microbiano relacionada à produção de biossurfactante

Integrando com os mecanismos genéticos, fatores nutricionais e ambientais também estão relacionados com a produção de biossurfactantes. A cinética da produção de biossurfactante exibe muitas variações relacionadas à utilização de substrato durante o crescimento microbiano. A produção pode estar relacionada ao crescimento (Figura 9 A), ou pode ocorrer em condições limitantes de crescimento (Figura 9 B). No primeiro caso, a produção inicia simultaneamente ao crescimento microbiano, à medida que o substrato é utilizado. Já a produção em condições limitante de crescimento ocorre somente na escassez do substrato (DESAI; BANAT, 1997).

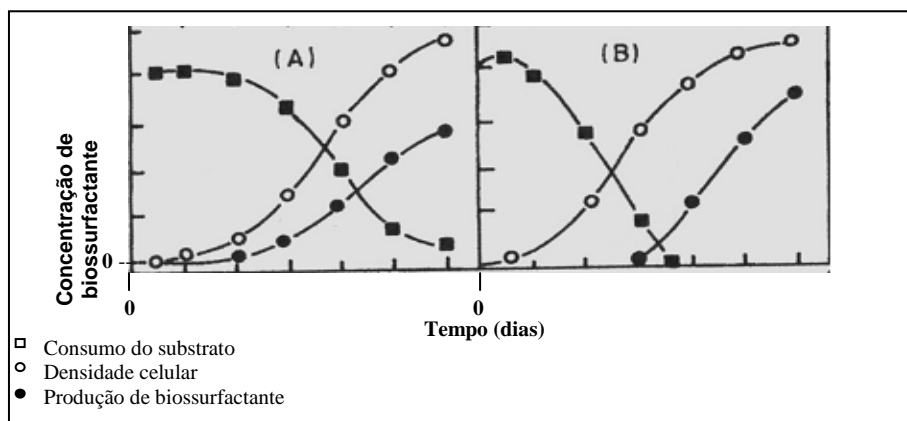


Figura 9 – Ilustração esquemática de dois diferentes tipos de cinética de crescimento para a produção de biossurfactante. (A) Produção de biossurfactante associada ao crescimento microbiano em *Acinetobacter calcoaceticus*. (B) Produção de biossurfactante em condição limitante de crescimento em *Pseudomonas aeruginosa*.

Fonte: (DESAI; BANAT, 1997)

2.2.4.1. Fatores nutricionais

Dentre os fatores nutricionais que influenciam no processo de produção de biossurfactante, pode-se destacar as fontes de carbono e nitrogênio disponíveis no meio. (DESAI; BANAT, 1997). Cada microrganismo necessita de um meio apropriado para seu crescimento, de modo que a escolha do meio ideal para a produção de biossurfactante irá depender da linhagem de microrganismo que será utilizado, avaliando as melhores condições para o seu desenvolvimento. Além disto, a composição do meio de cultura pode afetar na composição do biossurfactante em algumas bactérias (DESAI; BANAT, 1997; ZHANG; MILLER, 1995).

Fontes de carbono solúveis em água, como glicose, glicerol, manitol e etanol são utilizadas para a produção de ramnolipídio por *Pseudomonas* sp. No entanto, a produção pode ser aumentada com a adição ao meio de cultura de compostos hidrofóbicos, como hidrocarbonetos alifáticos e, até mesmo, aromáticos (DESAI; BANAT, 1997; DÉZIEL et al., 1996). Santa Anna et al. (2002) compararam a produção de ramnolipídio por *P. aeruginosa* utilizando n-hexadecano, parafina, óleo de babaçu e glicerol como substrato. A maior produção do biossurfactante, assim como a menor tensão superficial, ocorreu quando foi utilizado o glicerol como substrato, o que já era esperado, pois esta fonte de carbono é mais fácil de ser assimilada pelo microrganismo que as outras. No entanto, a suplementação do meio com pequenas quantidades de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) no início do cultivo antecipa a produção de biossurfactante em *P. aeruginosa* (DÉZIEL et al., 1996).

Bactérias produtoras de biossurfactantes crescidas em glicose podem aumentar sua produção através da suplementação do meio com HPA durante a fase estacionária do crescimento microbiano. Porém, alguns microrganismos só produzirão biossurfactantes quando iniciar o consumo de hidrocarbonetos, ou seja, somente após todo o carbono solúvel no meio ter sido consumido. Neste caso a utilização de hidrocarbonetos é essencial à produção de biossurfactantes (DESAI; BANAT, 1997).

Com o objetivo de minimizar os custos de produção, resíduos agroindustriais têm sido utilizados como substrato na a produção de biossurfactantes. Incluem: sobras

de colheitas de mandioca, soja, beterraba, batata doce, batata, sorgo, trigo e arroz; cascas de soja, milho e arroz; bagaço de cana e mandioca; resíduos da indústria de café (polpa, casca e borra de café); resíduos das indústrias de processamento de suco de maçã, uva abacaxi, banana, cenoura; resíduos da fabricação de doces; e ainda, outros substratos, como serragem, espigas-de-milho, resíduos da fabricação de chá e raízes de chicória (MAKKAR, CAMEOTRA, 2002; PANDEY et al., 2000). Outros substratos imiscíveis em água têm sido sugeridos para a produção de biossurfactantes, tais como melado, soro do leite e resíduos de destilaria (MAKKAR, CAMEOTRA, 2002).

O metabolismo do nitrogênio está diretamente relacionado à produção de biossurfactantes. A capacidade de utilizar nitrato, amônia e aminoácidos como fontes de nitrogênio é amplamente observada entre os microrganismos desnitrificantes (MULLIGAN; GIBBS, 1989). Amônia e uréia são as fontes de nitrogênio preferidas para a produção de biossurfactante por *Arthrobacter parafineus*, enquanto o nitrato mostrou ser a melhor fonte de nitrogênio para *Pseudomonas* e *Rhodococcus*. A estrutura da surfactina, produzida por *B. subtilis* é influenciada pela concentração de aminoácido no meio, podendo produzir valina ou leucina como o sétimo aminoácido da cadeia (DESAI; BANAT, 1997). A assimilação do nitrato é realizada pelas reações de redução do nitrato a amônia, catalisada pelas enzimas redutase do nitrato e redutase do nitrito, seguida pela reação de assimilação da amônia. Existem dois mecanismos bioquímicos pelos quais a amônia é assimilada. Um deles consiste na redução a glutamato em uma única etapa, catalisada pela glutamato-desidrogenase (GDH), e é eficaz em ambientes onde existe uma grande quantidade de amônia (Figura 10A). O outro consiste num processo de duas etapas, em que a glutamina atua como intermediário na formação do glutamato, através das enzimas sintetase da glutamina (GS) e sintetase do glutamato (GOGAT), e ocorre em ambientes onde existe pouco suprimento de amônia (Figura 10B,C). O glutamato é o principal doador de grupos amina nas reações de formação dos aminoácidos (MADIGAN et al., 2000; MULLIGAN; GIBBS, 1989). Mulligan e Gibbs (1989) descreveram a relação das atividades destas enzimas na produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando várias fontes de nitrogênio. Nesse trabalho, o aumento dos

níveis de GS coincidiram com o decréscimo da atividade de GDH, indicando a preferência para a via GS-GOGAT durante a produção de biossurfactante. Esta condição pode ser obtida em meio pobre de íons amônio. Níveis baixo de amônio promovem uma maior assimilação do nitrogênio, pois a via GS-GOGAT é ativada produzindo duas moléculas de glutamato. Assim, neste estudo, culturas que produziram maior atividade de GS foram as que aumentaram a produção de biossurfactantes (MULLIGAN; GIBBS, 1989).

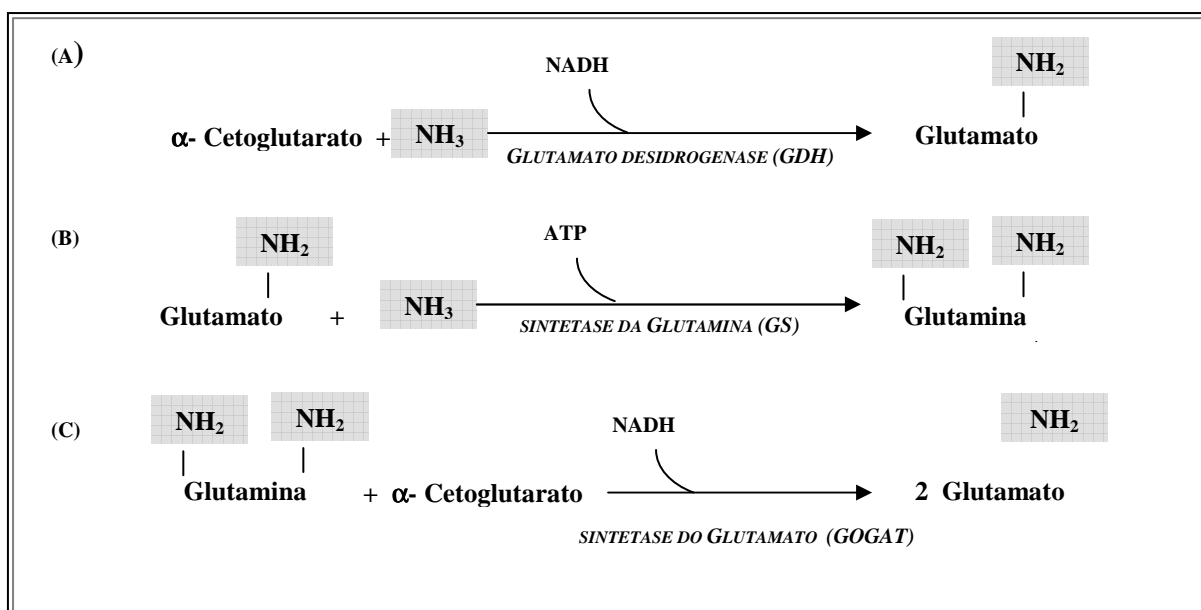


Figura 10 – Assimilação da amônia em bactérias. Quando a concentração de NH_3 é elevada, as células são capazes de assimilar o composto através da reação da glutamato-desidrogenase. Quando a concentração de NH_3 é baixa, as células realizam as reações da glutamina-sintetase e glutamato sintetase, para utilizar a energia produzida pela hidrólise de uma ligação de pirofosfato na assimilação da amônia.

Fonte: (MADIGAN et al., 2000 - modificado).

2.2.4.2. Fatores ambientais

Fatores ambientais como pH, temperatura, agitação e disponibilidade de oxigênio também afetam a produção de biossurfactantes. Dentre os produtores de biossurfactante, a faixa ótima de pH para a produção está entre 6,5 e 8. Porém, a atividade dos biossurfactantes permanece estável em uma extensa faixa de pH

(DESAI; BANAT, 1997). A temperatura e a aeração também devem ser cuidadosamente ajustadas no processo de produção de biossurfactantes, já que a grande maioria das bactérias produtoras de biossurfactantes cresce bem a temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e o tratamento térmico pode alterar a estabilidade de alguns biossurfactantes. Porém, algumas bactérias, como os bacilos termofílicos, são capazes de produzir biossurfactantes em temperaturas acima de 40°C , sem alterar a estabilidade e são utilizados na recuperação do petróleo em águas profundas. A velocidade de aeração também deve ser ajustada, dependendo do microrganismo em questão. Em leveduras, por exemplo, a produção de biossurfactante aumenta quando a agitação está elevada (DASAI; BANAT, 1997).

2.2.5. Função fisiológica dos biossurfactantes

No estudo da função fisiológica dos biossurfactantes, é importante enfatizar que eles são produzidos por uma vasta variedade de microrganismos e possuem diferentes estruturas químicas e propriedades superficiais. Portanto, é esperado que os biossurfactantes tenham diversas funções fisiológicas que possibilitem uma maior competitividade microbiana na busca pela colonização de um nicho ecológico. Como suas estruturas químicas e propriedades de superfície são tão diferentes, é natural que alguns grupos sejam mais vantajosos que outros em um determinado nicho ecológico. Assim, é impossível generalizar ou identificar uma ou mais funções comuns a todos os surfactantes microbianos (RON; ROSENBERG, 2001). O entendimento das funções fisiológicas auxilia no estudo da aplicabilidade industrial que estes compostos possuem. As principais funções naturais são resumidas na Tabela 2.

Tabela 2 – Principais funções fisiológicas dos biossurfactantes

Função Fisiológica	Referências
Emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água	MILLER; ZHANG, 1997; DÉZIEL et al., 1996; RON; ROSENBERG, 2001.
Remoção de metais pesados	HERMAN et al., 1995; RON; ROSENBERG, 2001.
Patogenia	SULLIVAN 1998
Atividade antimicrobiana	NITSCHKE; PASTORE, 2002; RON; ROSENBERG, 2001.
Habilidade em colonizar um determinado nicho ecológico	NITSCHKE; PASTORE, 2002; RON; ROSENBERG, 2001.

2.2.6. Potenciais aplicações industriais dos biossurfactantes

O conhecimento das diversas funções fisiológicas dos biossurfactantes facilita o entendimento de suas potenciais aplicações industriais. As Tabelas 3 e 4 resumem algumas aplicações terapêuticas (Tabela 3) e comerciais (Tabela 4) dos biossurfactantes.

Tabela 3 – Potenciais aplicações terapêuticas dos biossurfactantes

Biossurfactante	Microrganismo	Aplicações terapêuticas
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	Agente anti-micoplasma, anti-tumoral, anti-fúngico e anti-viral
Iturina	<i>B. subtilis</i>	Agente anti-fúngico
Pumilacidin		Agente anti-viral, propriedades anti-ulcerativas
Lipopeptídeos	<i>Streptosporangium amethystogene</i> sub sp <i>fukuiense</i> A1-23456	Fator estimulante da colonização de granulócitos (G-CSF)
Glicolipídios	<i>Canida antártica</i> T-34	Indução da diferenciação celular em promielócito humano em célula de leucemia linhagem HL60 e agente anti-tumoral
Trehalolipídio	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Inibição do vírus herpes simplex e influenza vírus
Trehalose dicorynomycolato		Propriedades anti-fúngicas

Fonte – (BANAT et al., 2000)

Tabela 4 – Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes

Funções	Aplicações Comerciais
Emulsificantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minério
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcário-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação avançada de petróleo (MEOR)

Fonte: (NITSCHKE; PASTORE, 2002)

2.2.7. O papel dos biossurfactantes na biorremediação

Os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos desempenham um papel fundamental em processos de biorremediação, tal que a produção de biossurfactante é extremamente importante nestes processos. Existem dois mecanismos pelos quais os biossurfactantes aumentam a taxa de degradação de hidrocarbonetos. Primeiro, os biossurfactantes podem solubilizar compostos hidrofóbicos entre as estruturas das micelas, aumentando efetivamente a solubilidade do hidrocarboneto e sua disponibilidade para a célula. Segundo, os biossurfactantes podem fazer com que a superfície da célula fique mais hidrofóbica devido a maior associação da superfície celular com o substrato hidrofóbico (AL-TAHHAN et al., 2000). A adição de biossurfactantes é vantajosa em locais onde o crescimento microbiano é lento (p.ex., em baixas temperaturas ou na presença de alta concentração de poluentes) ou quando

os poluentes consistem em HPAs (RON; ROSENBERG, 2002). Os biossurfactantes podem ser aplicados como aditivos para estimular o processo de biorremediação. Noordman e Janssen (2002) verificaram que a presença de ramnolipídio estimulava a degradação do hexadecano por *Pseudomonas aeruginosa* produtora deste biossurfactante. Isto provavelmente ocorreu devido ao aumento da hidrofobicidade da superfície celular bacteriana após a extração dos lipopolissacarídeos da parede pelo ramnolipídio (AL-TAHHAN et al., 2000).

Transferência horizontal de genes responsáveis pela síntese de biossurfactantes tem sido demonstrada em bactérias. Esta descoberta possui significantes implicações ecológicas em populações microbianas mistas, proporcionando uma maior variabilidade genética interespecífica entre microrganismos degradadores (OSTERREICHER-RAVID et al., 2000).

2.2.8. Viabilidade econômica no uso de biossurfactantes

A viabilidade econômica costuma ser o “gargalo” dos processos biotecnológicos, especialmente no caso da produção de biossurfactantes. Estes têm que competir com surfactantes de origem petroquímica em três aspectos: custo, funcionalidade e capacidade de produção para atender a necessidade da aplicação. O alto custo de produção é incompatível com o processo de recuperação avançada de petróleo (MEOR), o qual requer grandes volumes de biossurfactantes. Alguns fatores podem diminuir o custo de produção nesses casos, tais como: (i) seleção de microrganismos adaptados a área poluída; (ii) diminuição do custo do processo de recuperação do biossurfactante; (iii) crescimento microbiano em substratos mais viáveis economicamente (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

2.3. Diversidade microbiana

O estudo da microbiota presente em áreas contaminadas, através das técnicas tradicionais de cultivo, permite o isolamento de microrganismos degradadores,

potenciais produtores de biossurfactantes. No entanto, estas técnicas não permitem isolar e identificar a grande maioria da população microbiana presente no ambiente, pois os meios de cultura seletivos não são capazes de mimetizar as condições ambientais em que os microrganismos estão adaptados. Assim, para estudar a diversidade microbiana presente em amostras ambientais há necessidade de extrair o DNA microbiano total para analisar através de métodos moleculares.

O estudo da diversidade microbiana aborda questões sobre a composição, estrutura e equilíbrio ecológico dessas comunidades, além de buscar o entendimento sobre a atividade e função de seus habitantes (GIOVANNONI et al., 1990, TORVISK et al., 1990). Este estudo possui limitações, tais como descrições taxonômicas incompletas para a maioria das espécies conhecidas e, principalmente, a impossibilidade de cultivo e isolamento da grande maioria dos microrganismos. Os métodos tradicionais de classificação microbiana, baseados na morfologia e fisiologia, podem não refletir o comportamento microbiano que ocorre no meio ambiente, pois a mesma linhagem pode revelar diferentes características quando cultivada em laboratório. Portanto, existe uma necessidade crescente por métodos mais rápidos e eficientes para o estudo da diversidade microbiana (COUTINHO et al., 1999). Diversas pesquisas têm demonstrado que a grande maioria dos microrganismos presentes em amostras ambientais não pode ser isoladas pelos métodos de cultivo tradicionais. Apenas 0,001% a 0,3% dos microrganismos presentes na água do mar e em amostras de solo, respectivamente, são cultiváveis (AMANN et al., 1995). Muitos microrganismos presentes no solo são tão bem adaptados ao seu habitat natural que não se conseguem cultivá-los em laboratório (ROOSE-AMSALEG et al., 2001). Portanto, as técnicas tradicionais de cultivo além de subestimarem a grande diversidade microbiana presente em amostras ambientais, não traduzem o real comportamento microbiano que ocorre no meio ambiente (ROOSE-AMSALEG et al., 2001).

Com o desenvolvimento de técnicas para a análise dos ácidos nucleicos, DNA e RNA, o estudo da diversidade microbiana pôde ser explorado geneticamente, permitindo a identificação e enumeração de praticamente todos os membros da

comunidade microbiana. A análise do DNA fornece informação sobre a composição (estrutura) da comunidade, enquanto que a análise do RNA pode elucidar a atividade metabólica (função) das populações microbianas particulares (TREVORS; VAN ELSAS, 1989).

Os métodos moleculares apresentam vantagens em relação aos métodos tradicionais de cultivo, pois (i) são altamente específicos para detectar um gene ou seqüências de ácidos nucleicos de um organismo particular, ou de um grupo de organismos; (ii) dispensam o cultivo e o isolamento em cultura pura; (iii) são técnicas muito sensíveis, permitindo a identificação de um maior número de microrganismos; (iv) podem ser utilizados em estudos filogenéticos; e (v) em geral, o genoma bacteriano é altamente estável e não é afetado pelas condições de crescimento (COUTINHO et al., 1999).

Para o estudo da diversidade microbiana através de técnicas moleculares, os ácidos nucleicos, DNA ou RNA, devem ser inicialmente extraídos das populações microbianas mistas e utilizados nas diferentes estratégias moleculares, a fim de identificar os membros da população e determinar a complexidade da comunidade, esclarecendo as relações filogenéticas entre as espécies microbianas (ROOSE-AMSALEG et al., 2001; COUTINHO et al., 1999; LUZ, 2000). Existem diversas técnicas que visam extrair o DNA total de amostras ambientais. Porém, nenhum método é universalmente aplicável para o estudo de bactérias autóctones, pois cada tipo de amostra, devido a sua própria natureza, requer a otimização de um método de extração próprio (ZHOU et al., 1996). Microrganismos isolados são, naturalmente, mais facilmente lisados que os microrganismos autóctones não cultiváveis (JACOBSEN, 1995; TSAI; OLSON, 1991).

2.3.1. Extração do DNA total de solo

Os ácidos nucléicos constituem o material através do qual são realizadas análises filogenéticas (taxonômicas), tipagens de espécies ou linhagens e análises da diversidade microbiana de organismos em amostras ambientais. No entanto, para que

tais análises possam ser realizadas, o DNA precisa ser isolado (COUTINHO et al., 1999; KRSEK; WELLINGTON, 1999; ROOSE-AMSALEG et al., 2001). Todos os métodos descritos para a extração de DNA total de solo são baseados ou na extração do DNA celular, após o isolamento das células microbianas presentes no solo, ou através da lise direta de todo o material presente no solo. O segundo método é o mais utilizado por ser mais representativo sobre a comunidade microbiana total (ROOSE-AMSALEG et al., 2001). O processo de extração de DNA através da lise direta requer alguns procedimentos básicos, como resumidos na Tabela 5. A lise celular costuma ser uma etapa crítica no processo de extração, tendo por finalidade o rompimento de um maior número de células, para que os ácidos nucléicos sejam liberados em solução (Tabela 5). Este procedimento pode ser realizado combinando métodos físicos, químicos e enzimáticos (ROOSE-AMSALEG et al., 2001), porém por este método, o DNA extraído pode estar, em grande parte, degradado. Diante disso, a metodologia necessita ser cuidadosamente ajustada de acordo com cada amostra a ser analisada (COUTINHO et al., 1999).

Tabela 5: Principais tratamentos e suas funções na extração do DNA microbiano total de solo para o estudo da diversidade microbiana

Tratamento	Reagente / processo	Função
1. Lise		
<u>Objetivo:</u> Romper a parede e membranas celulares, liberando o DNA no meio. Pode ser:		
- Física	- Choque térmico; sonicação; fervura; <i>bead-beating</i> , maceração com N ₂ , etc.	Promover o rompimento da parede e membrana celular através de forças mecânicas.
- Química	- Detergentes: dodecil sulfato de sódio (SDS), triton 114, sarcosil, brometo de N-cetil-N,N,N-trimetilamônio (CTAB).	Dissolver os lipídeos de membrana, solubilizar, dissociar e desnaturar proteínas, inibir a ação de nucleases.
- Enzimática	- Proteases (proteínase K) e Lisozimas.	Desnaturar as proteínas de parede e membrana celular e hidrólise do muropeptídeo.

(continuação)

Tratamento	Reagente / processo	Função
2. Separação do DNA		
<u>Objetivo:</u> Separação do DNA dos demais componentes celulares	- Solventes orgânicos: fenol; fenol-clorofórmio; clorofórmio-álcool isoamílico. Tiocianato de guanidina.	Desnaturar proteínas e separar o DNA devido a formação de três fases: orgânica, intermediária (contendo as proteínas desnaturadas) e aquosa superficial (contendo o DNA). Agente caotrópico que realiza pontes de H com as moléculas de água, causando desestabilização das ligações entre as proteínas solúveis no meio e a água.
3. Precipitação do DNA		
<u>Objetivo:</u> Precipitação do DNA para ser ressuspenso em menor volume de água ou tampão, concentrando a amostra.	- Precipitação alcoólica: isopropanol; etanol. - Precipitação com sal: acetato de sódio; acetato de amônio. - Polietilenoglicol (PEG).	Retirar as moléculas de água das hélices do DNA, provocando sua precipitação. Neutralizar as cargas negativas (fosfato) do DNA, promovendo sua agregação. Reduzir o poder de solubilização da água.
4. Purificação		
<u>Objetivo:</u> Remoção de ácido húmico e fúlvico, matéria orgânica, endonucleases e demais inibidores da taq DNA polimerase.	- Polivinilpirrolidona (PVP); Polivinilpolipirrolidona (PVPP). - Cromatografia de filtração em gel. - Cromatografia de adsorção.	Adsorver compostos fenólicos e húmicos através da formação de pontes de H entre estes compostos. Através da utilização de colunas contendo resinas, permite a purificação do DNA devido a passagem das moléculas menores através os poros da coluna. Através da utilização de colunas aniônicas, permite a purificação do ácido nucleico após a adsorção do DNA por uma matriz de carga positiva.

O solo contém grande quantidade de ácido húmico, substância inibidora da *Taq* DNA polimerase, enzima responsável pela amplificação em cadeia do DNA na técnica de PCR. Substâncias húmicas são compostas por moléculas orgânicas heterogêneas, de

ocorrência natural, com coloração entre amarelo e preto, com pesos moleculares relativamente altos e resistentes à degradação (ROOSE-AMSALEG et al., 2001). Essas substâncias, em função de suas características químicas, são normalmente extraídas juntamente com os ácidos nucleicos da amostra ambiental. Desta forma, o DNA extraído através da lise direta deve passar por um tratamento de purificação, com a finalidade de remover os inibidores de *Taq* DNA polimerase (COUTINHO et al., 1999).

2.3.2. Análise dos genes que codificam o rRNA no estudo da filogenia e diversidade microbiana

Os esquemas de classificação taxonômicas tradicionais dos organismos vivos têm sido baseados nas análises fenotípicas. Entretanto, os avanços da biologia molecular, através da análise dos ácidos nucleicos, têm permitido uma classificação mais fidedigna, por serem métodos mais sensíveis (LUZ, 2000). Assim, a classificação taxonômica e filogenética entre os seres vivos passou a ser baseada em características moleculares, sendo a análise de seqüência dos genes para o RNA ribossomal (rRNA) amplamente aplicada em estudos filogenéticos (LUZ, 2000; NAHUM, 2001). Árvores filogenéticas baseadas na análise das seqüências dos genes do rRNA dividiram os seres vivos em três grandes domínios: *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*; porém, um mesmo ancestral é comum a todos os três domínios (HUGENHOLTZ, et al., 1998). A raiz da nova árvore universal, baseada na seqüência e estrutura do rRNA, representa um ponto na história evolucionária em que todas as vidas na terra compartilhavam um ancestral comum, o chamado ancestral universal (LUZ, 2000; WOESE et al., 1998; WHEELIS et al., 1992).

Os rRNAs (Figura 11) são moléculas “anciãs”, bastante conservadas e encontradas em todos os organismos vivos. Portanto, têm sido utilizadas para discernir inter-relações evolutivas, servindo como “cronômetros evolucionários” consideravelmente importantes. Com o passar do tempo, as espécies evoluem, e a seqüência de rRNA reflete as diferenças entre elas. As análises comparativas destas

seqüências podem fornecer a genealogia molecular para a formação de árvores filogenéticas, mostrando a posição evolutiva dos organismos e determinando inter-relações entre eles (LUZ, 2000).

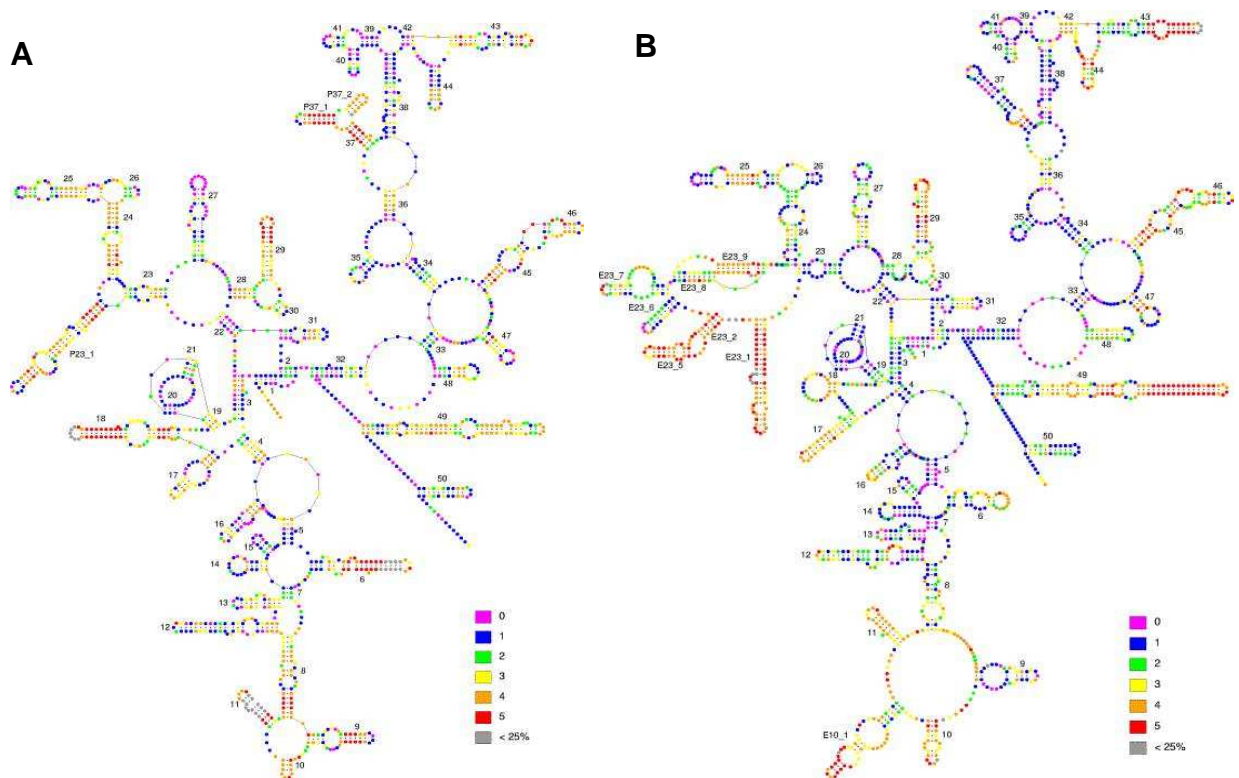


Figura 11 – Estrutura do rRNA 16S de *Escherichia coli* (A) e do rRNA 18S de *Saccharomyces cerevisiae* (B). Os nucleotídeos são divididos em cinco grupos, de acordo com a variabilidade entre as seqüências. As regiões mais variáveis estão marcadas de vermelho e as menos variáveis em azul. As regiões totalmente conservadas estão marcadas de lilás. A cor cinza representa regiões presentes no cromossomo de *E. coli* (A) e *S. cerevisiae* (B) porém ausentes em 75% das demais bactérias e leveduras.

Fonte: (VAN DE PEER et al., 1996)

É a ubiquidade das moléculas de rRNA que permite que a análise de suas seqüências possam ser utilizadas para relacionar os organismos entre si. A molécula de rRNA possui seqüências interespecíficas altamente conservadas e regiões flangeadoras com maior variabilidade, possibilitando a análise filogenética nos diferentes níveis taxonômicos (FUNGARO, 2000; GUTELL et al., 1994; VAN DE PEER et al., 1996).

A região do DNA que codifica o rRNA apresenta-se como um cluster gênico, repetido centenas de vezes no genoma (Figura 12), no qual se tem os genes 18S, 5,8S e

28S, em eucariotos (FUNGARO, 2000); estes genes são separados por regiões extremamente variadas denominadas ITS (*internal transcribed spacer*; HEAD et al., 1998), conforme ilustra a figura 12A. A região 18S, por exemplo, é a mais conservada e, por isso, é utilizada apenas para comparação de organismos distantemente relacionados. A porção 28S é mais variável e, portanto, é apropriada para a comparação de diferentes gêneros ou, em alguns casos, de diferentes espécies (FUNGARO, 2000).

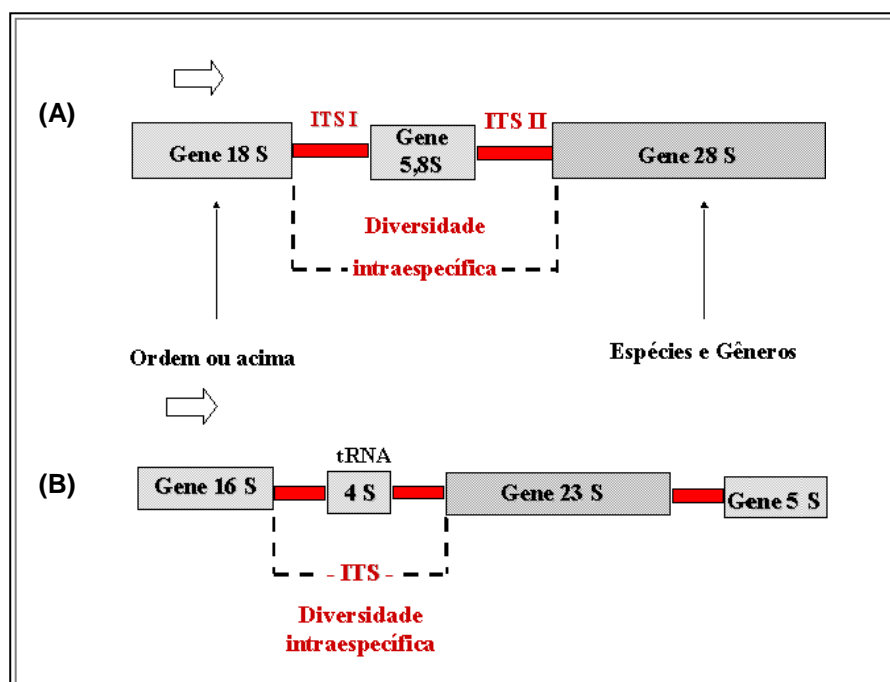


FIGURA 12 – Estrutura do cluster gênico que codifica o rRNA em eucariotos (A) e em bactéria (B). A região ITS é a que apresenta maior variabilidade genética entre as espécies.

Fonte: (FUNGARO, 2000; SNUSTAD; SIMMONS, 2001 – modificado).

Em procariotos, a região do DNA que codifica o rRNA apresenta os genes 16S, 4S e 23S e 5S. Entre os genes 16S e 23S está presente a região ITS altamente variada e, portanto, adequada para os estudos de diversidade intraespecífica em bactérias, conforme Figura 12B (GUTELL et al., 1994). O gene para o rRNA 16S é uma excelente molécula marcadora para análise filogenética, uma vez que (i) está presente em todas as bactérias; (ii) apresenta região conservada assim como região variada (região ITS flanqueadora dos genes 16S e 23S), tornando possível o desenvolvimento

de *primers* e sondas com diferentes níveis de especificidade; (iii) tem informação de seqüência suficiente para inferência filogenética; e (iv) está presente em grande número e células, o que facilita sua detecção (MUYZER; SMALLA, 1998). Além disso muitas seqüências estão disponíveis em bases de dados de livre acesso, tais como *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e RDP – *Ribosomal Database Project II* (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>).

As regiões ITS, tanto em eucariotos quanto em procariotos, evoluem rapidamente e são apropriadas para discriminar espécies relacionadas, ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. O fato das regiões ITS serem flanqueadas por segmentos conservados, serem relativamente curtas (300 a 500 pb em procariotos e 500 a 800 pb em eucariotos) e aparecerem em grande número de cópias no genoma de eucariotos, permite que sejam amplificadas e seqüenciadas com facilidade (FUNGARO, 2000).

2.3.3. Estudo da diversidade microbiana através da técnica de DGGE

Diversas técnicas moleculares podem ser empregadas no estudo da diversidade microbiana, a partir da análise do gene que codifica o rRNA (rDNA). Dentre as técnicas mais utilizadas, o DGGE (*Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis*) tem sido uma importante ferramenta para o estudo filogenético das comunidades microbianas mistas, além de permitir a identificação de microrganismos não cultiváveis. O DGGE é uma técnica baseada na eletroforese dos fragmentos de DNA, previamente amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), em gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear de agentes desnaturantes (uréia e formamida) de DNA (COUTINHO et al., 1999). Para o estudo da diversidade microbiana, o gene para o rRNA tem sido frequentemente utilizado (MUYZER, et al., 1993); entretanto, outros genes preservados podem ser igualmente analisados por DGGE (COUTINHO et al., 1999).

Durante a corrida eletroforética, pequenas regiões denominadas domínios de desnaturação sofrem dissociação das fitas dupla-hélice de DNA, gerando moléculas

parcialmente desnaturadas com mobilidade eletroforética retardada. Quando o último domínio (o mais estável) sofre desnaturação, o fragmento tem suas fitas complementares totalmente dissociadas e o poder de resolução do gel é perdido. Contudo, uma seqüência rica em guanina (G) e citosina (C), cerca de 40 bases, é acoplada a extremidade 5' do *primer forward*. Assim o fragmento do rDNA amplificado desnatura como um domínio único durante a corrida eletroforética e esta seqüência rica em GC permanece em configuração duplex, impedindo a completa separação das duas fitas da molécula de DNA. As variações na composição de bases dentro destes domínios alteram o comportamento da desnaturação e, conseqüentemente, o padrão eletroforético no gel desnaturante apresenta-se diferente para cada microrganismo (MEYERS et al., 1985).

O número de bandas visualizadas no gel é, na maioria das vezes, proporcional ao número de indivíduos diferentes que constituem as populações. No entanto, em algumas linhagens, duas ou mais bandas têm sido destacadas, devido à heterogeneidade das seqüências do operon do gene para rRNA, ou seja, o mesmo operon pode ser repetido no genoma de forma heterogênea, gerando bandas diferentes em microrganismos da mesma espécie. Portanto, nem sempre o número de bandas em um gel corresponderá, necessariamente, ao número de indivíduos presente na população em estudo. Além disto, as informações das seqüências genéticas geradas a partir do DGGE são limitadas, uma vez que a separação dos produtos de PCR maiores que 500 pb é reduzida, diminuindo a sensibilidade da técnica (MUYZER; SMALLA, 1998).

A análise da seqüência de DNA, após a separação eletroforética em gel desnaturante, foi originalmente desenvolvida na pesquisa médica para detectar, identificar e localizar mutações de ponto, naturais e induzidas (FISHER; LERMAN, 1983). Atualmente, o DGGE é amplamente empregado para o estudo da ecologia microbiana molecular, aliada à extração direta de DNA da comunidade, estudos filogenéticos dos membros da comunidade e estudo da dinâmica de populações específicas em função de variações ambientais ou das condições operacionais de um sistema (COUTINHO et al., 1999; MUYZER et al., 1993; TESKE et al., 1996). Por

fim, o DGGE também é útil para comparar a eficácia e a reprodutibilidade de diferentes protocolos de extração de DNA.

A caracterização da diversidade microbiana responsável pela degradação de petróleo torna-se necessária para o entendimento da ecologia microbiana das áreas contaminadas, relacionando os microrganismos encontrados com a eficiência do bioprocessamento de degradação. Dentro do projeto de investigação no qual se insere este trabalho aqui apresentado, será esta caracterização da diversidade microbiana por DGGE a próxima etapa.

CAPÍTULO I

(artigo em processo de submissão)

Differential surfactant activities of microorganisms isolated from a petrochemical landfarm soil of humid tropical climate in the northeast region of Brazil.

MACIEL, B.M., FIGUEIREDO, V.R., ARGÔLO FILHO, R.C., LOGUERCIO, L.L., DIAS, J.C.T., REZENDE, R.P. *

Dept. of Biological Sciences, UESC - State University of Santa Cruz, Rod. BR 415, Km 16, Ilhéus-BA, 45650-000, BRAZIL.

Running title:

"microbial surfactant activities from tropical landfarm soil"

** Correspondence and proofs should be addressed to:*

Dr. Rachel Passos Rezende
Dept. of Biological Sciences
UESC - State University of Santa Cruz
Rod. Ilhéus-Itabuna, Km 16
Ilhéus-BA, 45650-000, Brazil

phone: 011 55 73 680 5285

fax: 011 55 73 680 5226

e-mail: rachel@uesc.br

ABSTRACT

In the attempt to assess the presence and surfactant potential of naturally occurring microbes from a tropical environment, in a soil subjected to petrochemical contamination, a sample from the landfarming of the Landulpho Alves Petroleum Refinery (Bahia, Brazil) was processed to allow the isolation of the indigenous microbial community capable of growing on petroleum as the exclusive carbon source. Out of 60 isolates screened by petroleum-based growth, 11 demonstrated surfactant activities over various types of oils by drop-collapse methodology. These surfactant-producing isolates revealed four distinct groups on the basis of their growth profile in liquid culture for 132 h. All of them had their first detection of surfactant activity in a narrow range of time (between 90 and 96 h), showing differences in the levels of surfactant activities, assessed by a supernatant-dilution procedure followed by the drop-collapse test. The growth profiles and surfactant activities, suggests that the 11 isolates are distinct microbial entities, with potentially different surfactant compounds, possibly useful to a variety of industrial and environmental applications. Consequences of these findings and future directions of research aiming at the development of strategies for bioremediation of petrochemicals-contaminated areas are discussed.

KEY-WORDS: Biorremediation - biosurfactant - biodegradation - landfarm - microbial community - petrochemical industry - petroleum.

INTRODUCTION

Biosurfactants are produced by a wide array of microorganisms and have different surface properties, chemical structures and molecular size (Karanth et al, 1999). As synthetic surfactants, biosurfactants stabilize dispersions of one liquid in another, e.g. oil in water emulsions (Ron and Resenberg, 2001), and have a variety of potential applications. A number of environmental and industrial uses has been reported, such as bioremediation of areas contaminated by hydrocarbons, crude oil or toxic heavy metals; oil recovery enhanced by microbes (MEOR); application as additives in cosmetic, food and pharmaceutical industries; use in pesticides and herbicides formulations; and production of therapeutic compounds with antibiotic, antiviral and antitumor effects (Makkar and Cameotra, 2002; Nitsche and Pastore, 2002; Desai and Banat, 1997). Despite all these increasing interests in the use of biosurfactants, little is currently known about the ecology and/or distribution of biosurfactant-producing organisms in the environment (Boudour and Miller-Maier, 1998; Bodour et al., 2003), specially in tropical climates. It is, therefore, reasonable to assume that different types of biosurfactants have different roles in the growth of its producing microorganisms in a specific ecological niche (Ron and Resenberg, 2001). The identification, characterization, molecular genetics and roles of biosurfactants produced by various microorganisms have been extensively reviewed (e.g. Makkar and Cameotra, 2002; Nitsche and Pastore, 2002; Ron and Resenberg, 2002; Ron and Resenberg, 2001; Karanth et al, 1999; Sullivan, 1998; Desai and Banat, 1997).

Several methods have been described for a rapid qualitative and quantitative screening of microorganisms with potential biosurfactant activities, most of them based on the capability of reducing surface and interfacial tensions in aqueous media. The analytical methods include axisymmetric drop shape analysis (ADSA) (Van der Vegt et al, 1991), rapid drop-collapsing test (Jain, 1993), direct thin-layer chromatographic technique (Matsuyama et al, 1991), estimation of the emulsification index value (E-24, Cooper and Goldenberg, 1987), and several colorimetric methods, useful for different classes of surfactants (e.g., Shulga et al, 1993; Hansen et al, 1993; Siegmund and Wagner). The estimation of biosurfactant activity can be easily

achieved by tensiometer measurements, with the critical micelle concentration (CMC) calculated by the solubility of the surfactant in an aqueous phase (Desai and Benat, 1997). Nevertheless, the 'drop-collapse' method has demonstrated several advantages over methods that measure surface tension, since a smaller volume is required, the effective range of measurement is greater and it does not require specialized equipment (Boudour and Miller-Maier, 1998). This method is essentially based on the dispersion of an aqueous drop over an oil surface that is a direct consequence of the levels of surfactants present. Because these compounds display hydrophilic and hydrophobic groups in their molecules, they distribute along the aqueous-oily interface, causing an easily detectable reduction in the interfacial tension between the two phases (Nitsche and Pastore, 2002).

The petrochemical industry is extremely diverse, dealing with petroleum-derived products with a recalcitrant nature in terms of biodegradation, which cause significant pollution problems upon their release into the environment (Gaylarde, 1996). Among the various methods used to mitigate the effects of petrochemical pollutants, 'landfarming' is the one of choice by various refineries, as it allows, at lower costs, the conversion of large amounts of hazardous wastes containing degradable constituents into less toxic materials to humans and the environment. This is achieved by cultivating spread wastes mixed with the upper soil layer, such that indigenous microorganisms are induced to biodegrade those contaminants (Ausma et al, 2003). After completion, the treated soil can be used again, since contaminants were reduced to safe levels, according to regulatory guidelines. Therefore, landfarm soil is the natural source of organisms that are capable to degrade petroleum-derived products.

Several studies have suggested that biosurfactants enhance the biodegradation of poorly soluble organics by increasing their availability for cell uptake and use as carbon source. This occurs either by increasing the aqueous miscibility of the hydrophobic compound through solubilization within micelle structures, or by turning the cell surface more hydrophobic, which allows its association with the poorly soluble substrates (Al-Tahhan et al, 2000). Hence, the search for microorganisms able to

produce surfactant activities in environments contaminated by hydrophobic compounds becomes relevant. Little is currently known about biosurfactant-producing microorganisms isolated from tropical climate environments, thus the objectives of this research were to isolate microorganisms from a landfarm soil of the Landulpho Alves Petroleum Refinery (Bahia, Brazil) that are capable to grow in petroleum as the unique carbon source, and to preliminary study the production and activity of surfactant compounds. The results indicated that a variety of petroleum-grown microorganisms could be recovered from landfarm soil, showing differences in their growth patterns and surfactant activities. Potential application of these findings in the development of environment cleaning strategies were discussed.

MATERIALS and METHODS

Soil source

Approximately 2 Kg of a soil sample from the petrochemical waste landfarming of the Landulpho Alves Petroleum Refinery (Petrobras Co.), located at São Francisco do Conde (Bahia, Brazil), was collected from a layer corresponding to the first 10 cm of depth. The soil sample was sealed in an aluminum container and transported on ice to the lab, where it was kept at 4° C. A soil sample from the Atlantic Forest (humid tropical climate) was used as the negative control.

Indigenous microbial community isolation

Five grams of each soil sample (control and landfarm) were inoculated into a 250 mL flask containing 50 mL of Phosphate Buffer, pH 7.0, and incubated at 28°C (\pm 2°C) under constant agitation at 200 rpm during 21 days. Aliquots of 1 mL of soil suspension were collected at different incubation times (0, 3, 7, 14 and 21 days after inoculation), and a 10-fold dilution was performed using sterile saline solution (NaCl 0.9%). One mL of each dilution was poured onto Petri-dishes containing 2% agar 'rich' medium (RM - 0.5% beef extract, 1% peptone, 0.5% NaCl, pH 7.0; Li et al, 2000) to count the total viable bacteria. Afterwards, a so-called 'degradation' medium (DM) consisting of 2% agar, 0.1% KH₂PO₄, 0.1% K₂HPO₄, 0.1% NH₄NO₃, 0.05% MgSO₄,

0.001% saturated FeSO₄ solution, 0.001% saturated CaCl₂, pH 7.2 (Li et al, 2000) was used to select microorganisms able to growth in petroleum as the unique source of carbon. After autoclaving for 25 min and cooling, 2% of crude petroleum was added into the medium, which was poured onto Petri-dishes before solidification. Estimation of the microbial populations (cfu.mL⁻¹) was determined after incubation at 25° C for 48-72h.

Screening and preliminary characterization of surfactant-producing microorganisms

Isolated colonies from DM were inoculated into 100-mL flasks containing 5 mL of liquid RM and incubated at room temperature (28°C ± 2°C) under constant agitation at 130 rpm during five days. The drop-collapse method was used according to Bodour and Miller-Maier (1998) to select microorganisms showing surfactant activities. The technique was performed in a 96-microwell (12.7 x 8.5 cm) polystyrene plate. The wells were individually rinsed three times with hot water, ethanol and distilled water, and allowed to air-dry; each well was then coated with a 1.8 µL of mineral oil, which was allowed to settle for one to two hours. For qualitative tests, other types of oils were also used, such as petroleum, diesel and 'biodiesel' fuels, and olive and soy. A 5-µL aliquot of each supernatant was delivered into the center of an oil-coated well and the results were visually determined after 1 min as follows: if the drop remained beaded, the result was scored as negative; if it otherwise collapsed, the result was scored as positive. SDS was used as positive control. These isolates were set to grow in 1 mL of liquid RM until saturation, and glycerol was added as a 20% final concentration (v/v) to establish the -80°C freezer stocks.

The parameters of culture supernatant color, and shape and color of colonies were evaluated for a preliminary morphological characterization of the isolates selected for surfacting capacity by drop-collapse methodology. Starting from the -80°C freezer stocks, each isolate was enriched in 5 mL of liquid RM, in a pre-culturing procedure with incubation at room temperature under constant agitation at 130 rpm during 24 h. This procedure was repeated anytime a fresh culture was needed (see

below). For the analysis of colonies morphology, a loopful of cells from the 24-h pre-cultures was spread over 2%-agar solidified RM and incubated at 30°C for 48 h, with exception of one isolate (31B), for which a 24-h growth was enough. In the case of supernatants' color evaluation, the same loopful of cells was inoculated in a 20-mL liquid RM and cultured for 132 h (five days). In both cases, the parameters were assessed by visual inspection.

Kinetics of Microbial growth and surfactant activity

The microorganisms selected by the drop-collapse methodology were pre-cultured as described above, and a standardized amount of 4×10^6 cfu.mL⁻¹ of each isolate was inoculated into 250-mL flasks containing 20 mL of liquid RM, being incubated in the same conditions during 132 h. Bacterial growth was monitored by assessing the optical density (O.D.) of cells in culture at a wavelength of 480 nm, using a scanning spectrophotometer SPD-M6A (Shimadzu™, city, ST), equipped with a UV detector. Samples of 1 mL per isolate were removed from the flasks at regular 12-h intervals and centrifuged at 5,000 rpm for 10 min. The pellets of cells were suspended in equal volumes of distilled water and properly diluted in order to assure that the absorbance readings (O.D. at 480 nm) always fell into the linearity range, i.e. 0.05 to 0.99; for determination of the microbial growth kinetics, the plotted O.D. values correspond to the original absorbance readings corrected on the basis of the dilution factors. To determine the time point for the first detection of surfactant activity during culture, the supernatant left for each isolate was used to perform de drop-collapse technique on petroleum substrate.

Quantitative evaluation of surfactant activities

The surfactant activity of each isolate was assessed exactly 24 h after the time point in which such activity was detected for the first time in culture by the drop-collapse method. After this time, the supernatant of each microorganism was diluted in distilled water, at the following ratios (v/v) 5/10, 4/10, 3/10, 2/10 and 1/10. In this test, 500 µL of each dilution was added into a 5-mL glass tube containing 180 µL of

petroleum. After 30 min, the surfactant activity of each dilution was observed by the micelles formation and oil recovery to the surface.

All the results presented in this article were performed at least three times.

RESULTS

Analysis of the indigenous microbial community in the landfarm soil

In order to verify the composition and extension of microorganisms capable to metabolize petroleum that are naturally occurring in soils, a soil sample was obtained from the landfarm of the Landulpho Alves Refinery, located at the tropical Northeast Region of Brazil, and processed for those studies. A total of 60 microbial strains were selected in a so called 'degradation' culture medium (DM) containing petroleum as the unique carbon source (Li et al. 2000). Both bacteria and mycelial fungi and yeast types were isolated, which are currently under a process of taxonomic identification and characterization. For comparative purposes, a 'control' microbial community was obtained from a soil sample collected from an Atlantic Rainforest spot that has never been in contact with industrial activities or contamination of any kind. Right after the suspension of the soils in phosphate buffer (PB) for incubation under agitation (see Methods), an aliquot corresponding to the 'zero-time' treatment was plated in rich medium (RM 0) to check whether the both samples contained viable microbes, which was confirmed by colonies detection at the level of 10^6 cfu.mL⁻¹ (Fig. 1). Concerning the total heterotrophic microorganisms present in landfarm and control soils, a maximal growth in RM was observed after seven days of incubation in PB. Not unexpectedly, the levels of microbial growth for the landfarm in this period was about four logs higher in RM (10^{11} cfu.mL⁻¹) than in DM (10^7 cfu.mL⁻¹). On the 14th day of PB incubation (RM 14, Fig. 1), a slight decrease of about one log in the number of microorganisms isolated was detected for both soils. Afterwards, the reduction observed in the total heterotrophics was more intense, likely due to a concomitant drop in the levels of nutrients naturally present in the soil samples (not shown). On the 21st day of PB incubation, the landfarm soil showed a slight increase of half a log in the detectable microorganisms by RM plating, in relation to the 14th day, but the

majority of them belonged to the 'fungi' category, which was not unexpected since these microorganisms normally require a longer time to achieve high rates of growth. With respect to the microbial detection in DM plates, the growth of microorganisms isolated from landfarm soil was intense, showing a peak in cfu.mL^{-1} on the 14th PB-incubation day (DM 14, Fig. 1) and a decrease after this period. On the other hand, for the microbial community of the control soil, a little and not sustained growth was detected in DM plates only after one day of PB incubation, likely due to the endogenous reserves of the microbes mobilized by the aqueous environment. After the third day of PB incubation, no microbial growth was observed, which essentially confirms that the microbial community in non-contaminated soils did not display species capable to utilize petroleum as substrate for growth (Fig. 1).

Screening for microbial surfactant activities

Out of the 60 microbial isolates obtained from the landfarm soil through PB incubation and DM plating, 11 bacteria displayed surfactant activity based upon the results of the drop-collapse test on mineral oil (Fig. 2); a preliminary evaluation of morphological and colorimetric parameters of the colonies and their liquid cultures indicated the 11 isolates are distinct (see below). In addition to mineral oil (used for the initial screening) and petroleum (objective of this study, Fig. 2), the 11 isolates also showed surfacting capacity on other types of oils with different physical and chemical properties, such as olive and soy oils, diesel fuel and biodiesel as well (data not shown).

Kinetics of the microbial growth and surfactant activity

The growth curves for the 11 isolates that showed surfactant activities in their supernatants are presented in Fig. 3. The plotted values of optical density (O.D.) at a 480-nm wavelength correspond to the spectrophotometer readings, corrected on the basis of the dilution factors required in each case to assure the linearity range of the light absorbance measurements. Based on the maximal O.Ds. found and the patterns of growth that determined the profiles shown in the graphs, the isolates could be

classified into four distinct groups here defined as 'I' to 'IV' (Fig. 3). For most isolates, the lag phase took place prior to the first 24 h of culture, and the peak of growth occurred at the 72-h time point, followed by a phase of steep decline (Fig. 3A, B and C). The isolates from group I (08B, 18B and 46A) could be characterized by the presence of two distinct rates of growth in the logarithmic phase, with a clear acceleration after 48 h, and an O.D. value around 9.0 for their maximum growth, whereas for group II (14B, 31B, 45B), a single growth rate was observed in the exponential phase and the maximal culture growth was about 33% higher, achieved at an average O.D. of 12.0 (Fig. 3A and B). The culture profile for the isolates of group II was very similar to the ones of group III (48, 50 and 58), except for the levels of maximum growth, which were two times higher for the latter, with the O.Ds averaging 25.0 (Fig. 3C). The isolates 55 and 59 (Fig. 3D) were separated into a fourth group clearly distinct from the others, as the maximum growth was achieved a day earlier (at the 48-h time point) and a well defined 24 h-duration stationary phase was observed right after the O.D. peaks, extending up to 72 h of culture.

Despite those evident differences observed among the four groups, so classified on the basis of their overall growth profile, preliminary experiments of culturing in liquid RM had indicated that the first detection of surfactant activity (over mineral oil) occurred in a narrow range of time for all the 11 isolates, i.e. between 90 and 92 h of culture (data not shown). As seen in Fig. 3, this pattern was essentially confirmed, even using a different substrate for the drop-collapse test (petroleum in this case), since the kinetics of surfactant activity for all the isolates indicated the narrow time range of 90 to 96 h of culture as the moment of its first detection. Interestingly, the declining-growth profiles of the cultures were temporarily reverted right after this first detection of surfactant activity, showing a second stationary phase, or even a slight increase in the microbial growth, during the period between 96 and 120 h (Fig. 3).

Quantitative analysis of the surfactant activities

In the attempt to compare the levels of surfactant activity on petroleum among the isolates, we established a period of 24 h after the detectable start of surfactants

production as a standard for supernatant collections and analysis. This procedure was based on the assumption that, after this 24-h extra time, the amount of surfactant compounds would be sufficient to allow detection of quantitative differences by serial dilutions of the supernatants, prior to the drop-collapse tests (Table 1). This dilution procedure is a relative measure of the minimal concentration of surfactant(s) still capable to be detected by the method. Hence, considering that higher dilutions represent lower concentrations of a given substance, it can be postulated that an activity retention at these more diluted conditions is a direct measure of higher surfactant activities. Consistent and reproducible differences among the isolates were observed, with the 55, 58 and 59 supernatants displaying the highest surfactant activities, as shown by its detection in higher dilutions, whereas for the isolates 8B, 14B and 31B, the surfactant activity was the lowest (Table 1). Overall, there was no direct association between any specific profile of culture growth (Fig. 3) and higher surfactant activities, with exception of group IV, whose members displayed the highest activities detected in our conditions (dilution 1:10, Table 1). Nevertheless, such an association was not exclusive for this group, since the isolate 58 also demonstrated activity at this highest dilution, but its growth pattern is typical of group III. In a similar manner, surfactant activities appeared not to be directly proportional to the levels of microbial growth, i.e., to the cell biomass present in the moment of supernatant collection; for instance, the isolates 48 and 50 showed the growth pattern 'III' of a higher biomass (Fig. 3C), but their surfactant activity was only intermediate (dilution 3:10, Table 1). Based on these results, one could conceive the levels of surfactant activity as another criterion for isolates grouping, which would be a further indication of their intrinsic differences (see below).

Differential characterization of the isolates with surfactant activity

An attempt was made to verify whether the 11 isolates under study were indeed distinct to one another, or only 'physiological variants' of one or few bacterial strains. Hence, as shown in Table 2, evaluations of morphological and colorimetric parameters were also performed to complement the classification schemes provided by the growth

profiles and surfactant activities. In most pairwise comparisons among isolates, differences in two or three out of the five traits studied were found; in this context, the isolates appearing to be more alike were the 55 and 59, the ones of growth pattern type IV, which were different only in the color of their supernatants (Table 2). Another growth profile that could be considered more homogeneous was the type II, whose isolates showed small differences basically in their colorimetric traits, although the 45B also differed in the levels of surfactant activity (Table 2). Taken together, the results of these analyses have provided overall a specific combination of traits for each isolate, which can be considered as a strong evidence that all the 11 isolates studied in this work are indeed particular 'entities', each of which having potentially distinct applicability (see Bodour et al., 2003). Further in-depth analyses are currently underway to provide a more detailed characterization of the species and strains to which these isolates belong, as well as to identify their predominant surfactant compounds.

DISCUSSION

Industrial petrochemical activities normally poses a threat to the environment that must be properly managed for the sake of sustainable development. In this context, microorganisms have a pivotal role in bioremediation processes aiming at the mitigation of hydrocarbon pollution from petroleum and their derivatives. Nevertheless, no microbial species is capable alone of degrading all petroleum components in a given contaminated area (Korda et al, 1997), an action that requires a mixture of microbes with complementary capabilities. The indigenous microbiota of a specifically affected environment is likely to be more adapted to its intrinsic nutritional and physicochemical conditions, such that in-depth studies of this microbial community will certainly contribute to the development of more effective bioremediation strategies to be applied in similarly affected areas. The work here reported have tested such an hypothesis by a series of experiments established to assess the potential diversity and petroleum-surfactant capability of a landfarm-derived microbiota in a humid tropical climate.

The 21-day incubation of the landfarm-sampled soil in phosphate buffer (PB) was employed with three major objectives: (i) to release the microbes attached to the particles and micelles, (ii) to provide a more suitable aqueous environment for some growing activity, and (iii) to allow the protective structures (like spores) to reinitiate their metabolism and start growing. Therefore, it was not unexpected that a certain qualitative and quantitative change in the microbial composition would occur during several days of soil incubation in PB, which was essentially confirmed by the observation that a distinct microbial composition was achieved at all time points tested (i.e., zero, three, seven, 14 and 21 days after the PB incubation began). When comparing the *in vitro* growth of microorganisms from undisturbed- and landfarm-derived soils in 'degradation' medium (DM), our results demonstrated that, indeed, petroleum has worked as an effective selective agent, allowing the development of only those microbes already adapted to the environmental conditions of the landfarm (Fig. 1). The lack of microbial species capable to grow on petroleum from soil of non-contaminated areas quite likely reflects the fact that ecological adaptation in these circumstances is not influenced by any kind of selective pressure for metabolization of this type of hydrocarbons, and so, the microbial community composition does not 'prioritize' microorganisms with such capability.

The identification of microorganisms capable of utilize petroleum as the sole carbon source is a first step toward a screening of strains producing surfactant compounds, and so, potentially useful in processes directed to bioremediate this kind of pollutants. The fact that only 18,3% of the petroleum-grown isolates (11 out of 60) revealed surfactant activities does not imply that other isolates could not also have shown surfactant properties, since the use of different screening conditions would quite likely reveal other organisms with distinct growth and, or surfactant properties (Bodour et al, 2003). In this study, the preliminary surfactant screening was performed based on mineral-oil only for the sake of technical ease; for our purposes, the drop-collapse test using this substrate was efficient enough to identify isolates with emulsifying activity over petroleum, as well as over several other types of oils, having distinct chemical composition and physical properties (such as viscosity). This,

thereby, indicates this technique was properly sensitive for such screening procedures, confirming previous studies (Bodour and Miller-Maier, 1998). Moreover, the surfactant activities identified in this way appeared to be of a versatile nature, suggesting a potential usefulness in many other practical applications.

Once defined a set of microbial isolates showing detectable surfactant activities on petroleum, the kinetics of their detection in the growth curve of each isolate was assessed. It is interesting to point out that, although the first detection of this activity for all the 11 isolates, was fairly similar, occurring in a narrow range of time (90 to 96 h, either on mineral-oil or petroleum; Fig. 3), the four quite different growth profiles obtained for the groups (which were otherwise consistent among isolates within a group) are suggesting that at least four distinct microbial strains were present. As discussed further, other criteria were added to this scenario to assess how different an isolate was from each other. Overall, though, the production of surfactant compounds in the isolates originated from the particular landfarm of this study was firstly observed in a specific timing of their growth, i.e., in the declining stages of the culture curves (Fig. 3). To our knowledge, this is the first report of a surfactant production starting so late in a rich-medium culture profile, which might be explained by the nutritional stress, a growth-limiting condition reported as being necessary for surfactant production in other systems, such as rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* (Guerra-Santos et al, 1984). Furthermore, although not as late as in our work, previous studies have already demonstrated that biosurfactants are secondary metabolites normally produced at later stages of growth, such as the end of the exponential phase, or during the stationary phase (Ron and Rosenberg, 2002; Déziel et al, 1996). Several authors have identified an association of the timing of surfactant production with the kinetics of microbial growth and the type of carbon source utilized (Noordman and Janssen, 2002; Desai and Benat, 1997; Déziel et al, 1996; Zhang and Miller, 1995). Basically, those enriched media (like the RM here used) containing water-soluble compounds of prompt availability as carbon sources tend to produce biosurfactants at, or around, the stationary phase, whereas those in which hydrophobic compounds are added have shown to anticipate in two or three days the biosurfactant

production in the culture (e.g. the *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ strain, Déziel et al, 1996). Moreover, the levels of biosurfactants produced in media containing only water-soluble carbon sources tend to be lower than in media with carbon sources based on hydrophobic compounds (Desai & Benat, 1997; Robert et al, 1989; Yamaguchi, 1976). It was noteworthy the fact that the beginning of detectable surfactant activity essentially coincided with the start of a short period of interruption in the cell biomass declining trend, which turned into a second stationary phase, or even into a quick increase in culture biomass for some isolates (Fig. 3). Taken together, these features are suggesting that the nutritional stress achieved at around four days of culture is inducing the synthesis and secretion of biosurfactants by the isolates under study, which is, in turn, causing a change in the nutritional conditions of the environment that is allowing a temporal extension of the culture survival. It is possible that the action of the surfactants is related to the mobilization of thus far insoluble compounds, turning them into newly available carbon sources, or else, that the surfactants themselves are serving as the carbon source for growth.

Interesting data have been suggesting that biosurfactants are related to growth and survival of microorganisms in the environment (Bodour et al, 2003). Nevertheless, the results of microbial growth kinetics and biosurfactant production for the 11 isolates indicated a lack of association between biomass production and surfactant activity, evaluated by a supernatant-dilution procedure, as the cultures displaying higher biomass at the moment of supernatant collection have not shown the highest surfactant activities (Fig. 3, Table 1). This is in agreement with the findings of Noordman and Janssen (2002), who demonstrated that some microorganisms increase the production of a given biosurfactant in response to its own secretion in the surroundings (a positive feedback mode), whereas others do not, requiring a higher mass of cells as the signal triggering the metabolic response for biosurfactant production. Moreover, as we shall discuss below, this appeared as a further indication that this group of 11 isolates is comprised of different microbes, since those differences in cultures biomass at the moment of supernatant collection were found among and within the four groups (Fig. 3). In terms of the differences in surfactant activity displayed by the isolates, it is

possible that those retaining activity under higher dilutions likely do so due to a quantitatively higher secretion of biosurfactants into the medium and/or a qualitatively different secretion of compounds with higher specific activities. Further experiments aiming at the quantification, purification and identification of the surfactant compounds secreted by the isolates will certainly address this question.

Taking into account that a further characterization of the isolates at the taxonomic, biochemical and molecular level are currently underway in our laboratory, a necessary preliminary differentiation of the 11 isolates under study was presented in Table 2, which summarized not only the growth profiles (Fig. 3) and surfactant activities (Table 1) discussed above, but also additional morphological and colorimetric parameters that contribute to a more detailed comparison among them. It has been postulated that even very similar, closely related isolates can produce subtly distinct biosurfactants useful in different applications, such that any screening methodology should be capable to detect those differences (Bodour et al, 2003). In this work, a series of parameters were used to provide a preliminary characterization of the 11 isolates selected for their ability to use petroleum as a substrate and to produce surfactant compounds able to emulsify it. Given the consistency of the results obtained throughout the work, the information presented in Table 2 strongly suggest that each isolate indeed represent a distinct microbial 'entity', with the biosurfactants they produce showing potentially different and specific applications, although not fully characterized up to this point. Overall, it was clear from our studies that the microbial diversity existing in the landfarm soil assessed is significant, so that it is worthwhile to continue its characterization aiming at identifying the strains and compounds just described, as well as others as much important for hydrocarbon-degradation processes, but not detected by the screening methodology here employed. In this sense, we are complementing these lines of investigation with metagenomics and other molecular characterizations, in the attempt to further study the diversity of naturally present but non-culturable organisms of the microbial consortium involved in the biodegradation of petroleum and its derivatives.

ACKNOWLEDGEMENTS

The financial support granted to Bianca Mendes Maciel was provided by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB (Brazil). Grants from FAPESB, CNPq and UESC.

REFERENCES

- Abu-Ruwaida, A.S., Banat, I.M., Haditirto, S., Khamis, A. 1991. Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant-producing *Rhodococcus* bacterium. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7: 53-61.
- Al-Tahhan, R.A., Sandrin, T.R., Bodour, A., Maier, R.M. 2000. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3262-3268.
- Ausma S, Edwards GC, Gillespie TJ. 2003. Laboratory-scale measurement of trace gas fluxes from landfarm soils. *J. Environ. Qual.* 32:8-22.
- Bodour, A.A., Miller-Maier, R.M. 1998. Application of modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J. Microbiol. Methods.* 32: 273-280.
- Bodour AA, Dress KP, Maier RM. 2003. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3280-3287.
- Cooper, D.G., Goldenberg, B.G. 1987. Surface active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 224-229.
- Desai, J.D., Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 (1): 47-64.
- Déziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lépine, F., Bisailon, J.G. 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1908-1912.
- Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 405-416.

- Gaylard, C.C. 1996. Biodegradation of petrochemicals. In EMBRAPA (ed) Workshop sobre biodegradação. Campinas, SP. 255p.
- Guerra-Santos, L.H., Käppeli, O., Fiechter, A. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as a carbon source. Appl. Environ. Microbiol. 48: 301-305.
- Hansen, K.G., Desai, J.D., Desai, A.J. 1993. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. Biotechnol. Tech. 7: 745-748.
- Jain, D.K., Thompson, D.L.C., Lee, H., Trevors, J.T. 1991. A drop-collapsing test for screening surfactant producing microorganisms. J. Microbiol. Methods. 13: 271-279.
- Karant, N.G.K., Deo, P.G., Veenanadig, N.K. 1999. Microbial production of biosurfactant and their importance. Curr. Sci. 77 (1): 116-126.
- Li, G., Huang, W., Lerner, D.N., Zhang, X. 2000. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. Wat. Res. 34 (15): 3845-3853.
- Makkar, R.S., Cameotra, S.S. 2002. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new application. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58: 428-434.
- Matsuyama, T., Sogawa, M., Yano, I. 1991. Direct colony thin-layer chromatography and rapid characterization of *Serratia marcescens* mutants defective in production of wetting agents. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1186-1188.
- Nitsche, M., Pastore, G.M. 2002. Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. Quim. Nova. 25 (5): 772-776.
- Noordman, W.H., Jansen, D. 2002. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 4502-4508.
- Robert, M., Mercade, M.E., Bosch, M.P., Parra, J.L., Espuny, M.J., Manresa, M.A., Guinea, J. 1989. Effect of carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T. Biotechnol. Lett. 11: 871-874.
- Ron, E.Z., Rosenberg, E. 2001. Natural roles of biosurfactants. Environ. Microbiol. 3: 229-236.

- Ron, E.Z., Rosenberg, E. 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 249-252.
- Shulga , A.N., Karpenko, E.V., Eliseev, S.A., Turovsky, A.A. 1993. The method for determination of anionogenic bacterial surface active peptidolipids. *Microbiol. J.* 55:85-88.
- Siegmund, I., Wagner, F. 1991. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species grown on mineral agar. *Biotechnol. Tech.* 5: 265-268.
- Sullivan, E.R. 1998. Molecular genetics of biosurfactant production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 263-269.
- Van der Vegt, W., Vander Mei, H.C., Noordmans, J., Busscher, H.J. 1991. Assessment of bacterial biosurfactant production through axisymmetric drop shape analysis by profile, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 766-770.
- Yamaguchi, M., Satom A., Yukuyama, A. 1976. Microbial production of sugar lipids. *Chem. Ind.* 17: 741-742.
- Zhang, Y., Miller, M.R. 1995. Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of *n*-alkanes. *Appl. Environ. Microbiol* 61: 2247-2251.

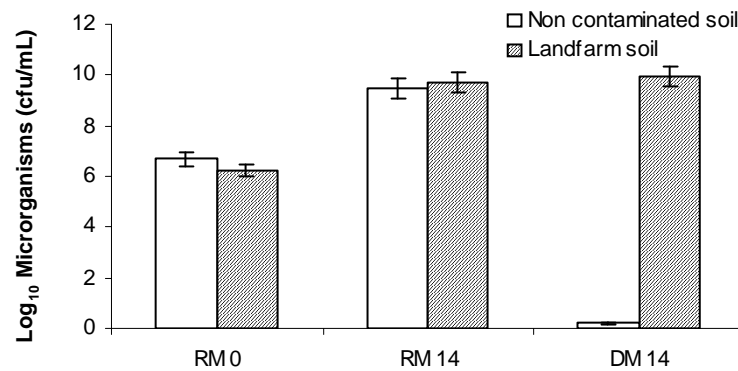


Figure 1: Comparative analysis of the indigenous microbial community in soils from disturbed and undisturbed environments. Soil samples from a landfarming (disturbed) and from an Atlantic Forest area (undisturbed), both located at the tropical northeast region of Brazil, were collected and incubated in phosphate buffer for 21 days; aliquots were taken at different days, properly diluted and set to grow in 'enriched' (RM) or 'degradation' (DM) media for analysis and counting of colonies. 'RM 0' and 'RM 14' (or 'DM 14') indicate aliquots taken from the phosphate buffer incubation at the onset of the procedure and after 14 days, respectively, and set to grow in the corresponding medium.

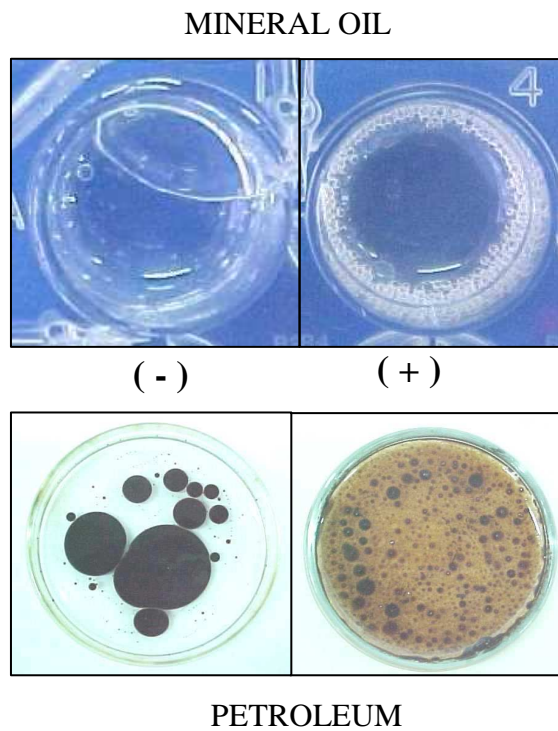


Figure 2: Typical results obtained for the drop-collapse method in two types of oil. Photographs indicate the appearance of a water control without surfactant activity (-), and the surfactant activity (+) of the supernatant from isolate 31-B (used here as an example), previously grown in RM.

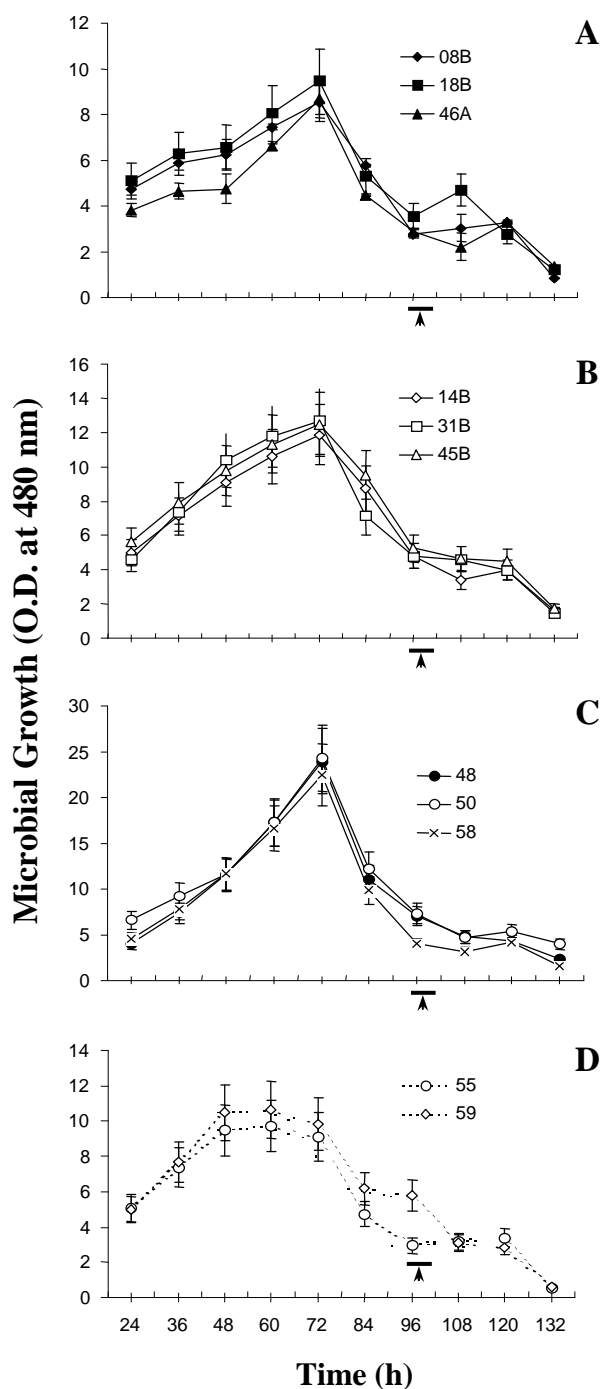


Figure 3: Kinetics of microbial growth and surfactant activity for the 11 petroleum-grown isolates. Based on the growth profiles obtained, the isolates could be classified into four groups - I (A) to IV (D). The bars pointed by an arrowhead indicate the range of time in which surfactant activities were first detected by the drop-collapse method. The numbers in the Y-axis correspond to the absorbances at 480 nm, properly adjusted to account for the dilutions needed to assure the readings fell within the linearity range of the spectrophotometer. Error bars represent three replicates of the experiment.

Table 1: Estimation of the petroleum-related surfactant activity for the 11 landfarm-soil isolates. ¹

Maximal dilution ²	Isolates
5 : 10	08B
4 : 10	14B; 31B
3 : 10	18B; 48; 50
2 : 10	45B; 46A
1 : 10	55; 59; 58

¹ Parameter assessed by the drop-collapse method in the bottom of test-tubes, using isolate supernatants collected after 24 h of culture since the first detection of surfactant activity (see Fig. 3).

² It indicates the last dilution level (in water) in which the surfactant activity is still detect. The numbers correspond to the ratio 'supernatant volume' / 'final volume'.

Table 2: Summarized characterization of the 11 landfarm-soil isolates.

Isolates	Maximal dilution ¹	Growth pattern ²	Colony aspects ³		Supernatant color ⁴
			contour	color	
08B	5 : 10	I	Regular	light pink	olive green
14B	4 : 10	II	Regular	light yellow	olive green
18B	3 : 10	I	Regular	green	yellowish green
31B	4 : 10	II	Regular	green	green
45B	2 : 10	II	Regular	green	olive green
46A	2 : 10	I	Irregular	green	olive green
48	3 : 10	III	Irregular	white	yellow
50	3 : 10	III	Regular	green	brown
55	1 : 10	IV	Irregular	green	blue
58	1 : 10	III	Regular	white	yellow
59	1 : 10	IV	Irregular	green	green

¹ See Table 1.

² See Fig. 3.

³ These characteristics were observed after 48 h of microorganism growth in 2% agar-solidified RM, except for the isolate 31B, which needed only 24 h of growth for those observations.

⁴ This characteristic was evaluated after 5 days of growth in liquid culture in RM, and the differences in color were consistent after three replicas of the experiments.

CAPÍTULO II
(artigo submetido)

**Simple DNA extraction protocol from Brazilian landfarm soil and PCR-based
detection of the 16S rRNA gene**

**MACIEL, B.M., FIGUEIREDO, V.R., ARGÔLO FILHO, R.C., DIAS, J.C.T., REZENDE,
R.P. ***

Dept. of Biological Sciences, UESC - State University of Santa Cruz, Rod. BR 415,
Km 16, Ilhéus-BA, 45650-000, BRAZIL.

Running title:

"DNA extraction protocol from Brazilian landfarm"

** Correspondence and proofs should be addressed to:*

Dr. Rachel Passos Rezende
Dept. of Biological Sciences
UESC - State University of Santa Cruz
Rod. Ilhéus-Itabuna, Km 16
Ilhéus-BA, 45650-000, Brazil

phone: 011 55 73 680 5285

fax: 011 55 73 680 5226

e-mail: rachel@uesc.br

A protocol for microbial DNA extraction from landfarm soil using direct lysis method by maceration with N₂ is reported. The efficiency of the extraction protocol was confirmed through the PCR amplification of the 16S rRNA gene. The methodology developed is an important tool for the study of the bacterial diversity responsible for petroleum degradation in contaminated environments.

Key words: Microbial DNA, bacterial diversity, direct lysis, PCR, petroleum degradation.

The majority of bacteria in environmental samples cannot be isolated or cultured using traditional cultivation techniques, and these microorganisms can indicate how well an ecosystem is functioning (Roose-Amsaleg et al., 2001; Amann et al., 1995). Analysis of total community nucleic acids extracted from soil samples from any environments using culture-independent methods permits the detection and phylogenetic identification of fastidious or as yet uncultured organisms (Juck et al., 2000). Microbial DNA extraction by direct lysis methods does not require cell isolation, and the extracted DNA seems to be more representative of the microbial community of the sample than cell extraction, because a greater number of microorganisms is subjected to the lysis, notably those sorbed onto soil organomineral aggregates (Roose-Amsaleg et al., 2001). Nevertheless, the methods used in studies on the autochthonous bacteria of environmental samples are not universally applicable; the range of methods described probably reflects the heterogeneity of soils and the nature of subsequent analysis of the DNA (Zhou et al., 1996). We report here a new protocol developed and tested for the extraction of microbial DNA directly from a landfarm soil and further polymerase chain reaction for the amplification of the 16S rRNA gene.

Soil from landfarm of the Landulfo Alves Petroleum Refinery, located in São Francisco do Conde, Bahia / Brazil, contaminated with petroleum waste was sampled from just below the surface to a depth of approximately 10 cm, sealed in aluminum flask and transported on ice to the Environmental Monitoring Laboratory of Universidade Estadual de Santa Cruz, where it was kept at 4° C until analyzed. Two

soil samples were analyzed in this study. The first of crude landfarm soil and the second one of landfarm soil constantly enriched with petroleum and minimal media (0.1% KH₂PO₄, 0.1% K₂HPO₄, 0.1% NH₄NO₃, 0.05% MgSO₄, 0.001% saturated FeSO₄ solution, 0.001% saturated CaCl₂, pH 7.0-7.2) (Li et al, 2000) during 9 months at room temperature under constant agitation at 130 rpm, with the objective of selecting only the microorganisms responsible for the petroleum degradation process. To extract DNA, 2 g of each soil sample was washed three times with TE buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8.0) and the mechanical lysis by maceration with N₂ was then performed. The soil was suspended in 2 mL of TE buffer (50/50) and an equivalent volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (24:24:1) was added, and the mixture was gently vortexed during 1 min. The mixture was centrifuged at 5,000 rpm at 4°C for 10 min and the supernatant collected. DNA was precipitated by the addition of 0.7 vol of cooled isopropanol and 10 vol of 3 M sodium acetate to the supernatant. The mixture was gently mixed (5-10 times) and kept at -20°C overnight. The sample was pelleted by centrifugation at 5,000 rpm for 10 min and the pellet was washed three times with cold 70% ethanol and resuspended in 100 µL of TE buffer (10mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0). The DNA extracted was then purified with the kit Wizard DNA Clean-Up System (Promega®). The same protocol was carried out, using 1 mL of guanidine thiocyanate 5M added to 1 mL chloroform-isoamyl (24:1) instead of phenol-chloroform-isoamyl, to compare both extraction methods. For visualizing the DNA extracts, 10 µL of the suspension was loaded onto 1.2% agarose gels. A region of approximately 360 bp from the 16S rRNA gene was amplified using primers F984 (5' - CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGAACGCGAAG AACCTTAC - 3') and R1378 (5'- CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG - 3') which are specific for almost all eubacterial 16S sequences. The underlined sequence in F984 indicates the GC clamp required for DGGE analysis. Each 50 µL PCR mixture contained 10 ng of soil DNA extracts, 1 X PCR buffer, 200 µM of each deoxyribonucleoside triphosphate, 0.2 µM of sense and antisense primers, 3.7mM MgCl₂, 0.4 mg/ml of BSA and 2.85 U *Taq* DNA polymerase (CENBIO®). The

amplification cycle consisted of an initial denaturation step of 5 min at 94°C, followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 2 min at 60°C and 1 min at 72°C and a final extension step for 10 min at 72°C. *Salmonella enterica* serotype Rubislaw lysates was used as a positive control in the PCR assay, while template DNA was suppressed from the reaction mixture for the negative control.

The direct lysis by maceration with N₂ is a simple and common process used for extraction of plant DNA. Regarding soil, this mechanical lysis proved to be very efficient, as a large amount of DNA could be obtained, indicating that there are many organisms present in the sample (Figure 1). Nevertheless, non-microbial DNA is also obtained with direct lysis, such as humic and fulvic acids. Since these contaminants can disturb or prevent subsequent molecular analyses, a purification step was required beyond prior sample washing step (Roose-Amsaleg et al., 2001; Krsek and Wellington, 1999). The use of phenol-chloroform-isoamyl (25:24:1) for DNA extraction was successful for both samples, unlike guanidine thiocyanate that was just efficient for the soil enriched with petroleum and minimal media. This fact probably happened due to the consumption of every organic components of this soil by the microorganisms during their growth in these nine months of incubation. In this sample, the method using phenol showed a DNA extract cleaner than the guanidine thiocyanate method, but the amount of DNA was smaller (Figure 1). However, for the crude landfarm soil sample, due to the presence of more organic matter, the extraction of total DNA was possible only by using phenol-chloroform-isoamyl alcohol. As it is known, there is not any universal protocol for the study of autochthonous bacteria of environmental samples; every type of sample requires optimization of the extraction methods (Roose-Amsaleg et al., 2001; Zhou et al, 1996; Harry et al., 1999). All extraction products were amplified with the primers for 16S rDNA (Figure 2). Since even trace concentrations of humic materials and hydrocarbons appear to be inhibitory to the PCR reaction, the presence of BSA in addition of 2.85 U *Taq* DNA Polymerase was necessary. The sensitivity, specificity and product yield of the rRNA 16S gene could be improved after purification with the kit Wizard DNA Clean-Up System (Promega®) In our research, the impact of culture-

independent studies on petroleum biodegradation process of landfarm soil is being evaluated and the phylogenetic view of bacterial diversity will be concluded.

Although many authors recommend the combination of the physical, chemical and enzymatic methods for cell lysis in soil sample, our results showed that the simple method of direct lysis by maceration with N₂ could yield large amounts of DNA with high molecular weight representing the total community of microorganisms. Besides, it was also possible to amplify total DNA with specific primers for the 16S rRNA gene for further analysis of the microbial diversity responsible for petroleum degradation in landfarm soil through the DGGE technique.

This study was supported by Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), Bahia State / Brazil. We would like to thank Dr. Janisete Gomes da Silva for comments on the manuscript.

REFERENCES

- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
- Harry, M., Gambier, B., Bourezgui, Y., Garnier-Sillam, E., 1999. Evaluation of purification procedures for DNA extracted from organic rich samples: interference with humic substances. *Analisis* 27, 439-442.
- Juck, D., Charles, T., Whyte, L.G., Greer, C.W., 2000. Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 33, 241-249.
- Krsek, M., Wellington, E.M.H., 1999. Comparison of different methods for isolation and purification of total community DNA from soil. *J. Microbiol. Methods* 39, 1-16.
- Roose-Amsaleg, C.L., Garnier-Sillman, E., Harry, M., 2001. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Appl. Soil. Ecol* 18, 47-60.
- Zhou, J., Bruns, M.A., Tiedje, J.M., 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 316-322.

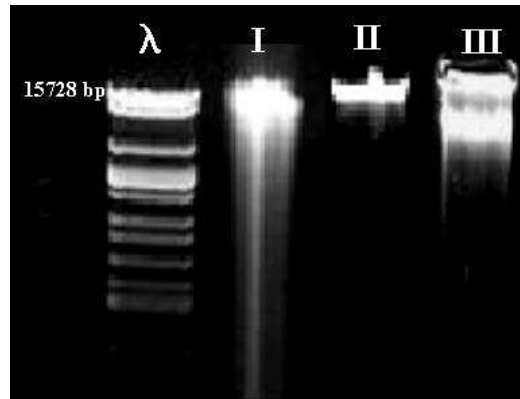


Figure 1: DNA extracted from landfarm soil contaminated with petroleum waste after electrophoresis on 1.2% agarose gel. **I** – Crude landfarm soil extracted with phenol-chloroform-isoamyl (24:24:1) by the delineated protocol. **II** - Landfarm soil constantly enriched with petroleum and minimal media extracted with phenol-chloroform-isoamyl (24:24:1) **III** - Landfarm soil constantly enriched with petroleum and minimal media extracted with guanidine thiocyanate plus chloroform-isoamyl alcohol(24:1). **λ** - Molecular weight marker (bacteriophage λ DNA digested by *Eco* R I, *Hind* III and *Bam* HI).

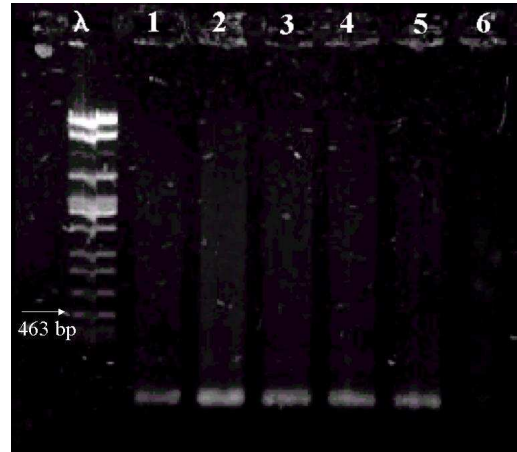


Figure 2: PCR amplification products targeting the 16S rRNA gene in soil DNA. **1 and 2** – PCR product of approximately 360 bp of 16S rRNA gene from DNA of crude landfarm soil. **3** - PCR product of 16S rRNA gene from DNA of landfarm soil constantly enriched with petroleum and minimal media extracted with phenol-chloroform-isoamyl (24:24:1). **4** - PCR product of 16S rRNA gene from DNA of landfarm soil constantly enriched with petroleum and minimal media extracted with with guanidine thiocyanate plus chloroform-isoamyl (24:1). **5** – *Salmonella enterica* serotype Rubislaw lyses as positive control. **6** – Negative control (water). **λ** - Molecular weight marker (bacteriophage λ DNA digested by *Eco* R I, *Hind* III and *Bam* HI).

CONCLUSÕES

- O solo do *landfarm* da Refinaria Landulpho Alves é composto por uma diversidade microbiana adaptada ao petróleo, extremamente importante no processo de biodegradação;
- Alguns membros desta comunidade são comprovadamente produtores de compostos com atividade surfactante. É notável que estes compostos podem ser utilizados em estratégias de biorremediação, assim como na recuperação avançada de petróleo;
- Os isolados selecionados neste trabalho diferem entre si, sugerindo serem linhagens fisiologicamente distintas;
- O método do colapso da gota mostrou ser eficiente para o *screening* de microrganismos potenciais produtores de compostos surfactantes, como também para a análise qualitativa de cada composto;
- A padronização de uma metodologia para a extração do DNA microbiano total de amostras ambientais é necessária para o estudo molecular da diversidade, e deve ser cuidadosamente ajustada para cada tipo de amostra, pois nenhum protocolo é universalmente aplicável.

PERSPECTIVAS

- Identificação bioquímica e molecular dos isolados;
- Recuperação e identificação dos compostos surfactantes;
- Otimização da produção dos compostos surfactantes;
- Análise da capacidade depuradora de cada isolado;
- Avaliação do consórcio microbiano na degradação o petróleo;
- Isolamento e caracterização de fungos e leveduras;
- Caracterização da diversidade microbiana não-cultivável presentes no solo de *landfarm* através do DGGE.

REFERÊNCIAS

- ABU-RUWAIDA, A.S.; BANAT, I.M.; ADITIRTO, S.; KHAMIS, A. Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant-producing *Rhodococcus* bacterium. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.7, p. 53-61, 1991.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LENIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia Molecular a Célula**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 1997. 1294 p.
- ALBUS, A.M.; PESCI, E.C.; RUNYEN-JANECKY, L.J.; WEST, S.E.H.; IGLEWSKI, B.H. Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.** v. 179, n. 12, p. 3928-3935, 1997.
- ALEXANDER, M. Biodegradation of Environmental Concern. **Science**, v. 211, p. 132, 1981.
- AL-TAHHAN, R.A.; SANDRIN, T.R.; BODOUR, A.A.; MAIER, R.M. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 8, p. 3262-3268, 2000.
- AMANN, R.I., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol. Rev.** v. 59, p. 143-169.
- AUSMA, S.; EDWARDS G.C.; GILLESPIE, T.J. Laboratory-scale measurement of trace gas fluxes from landfarm soils. **J. Environ. Qual.**, v. 32, p. 8-22, 2003.

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential applications of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BODOUR, A.A.; MILLER-MAIER, R.M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **J. Microbiol. Methods**, v. 32, p. 273-280, 1998.

BODOUR, A.A.; DRESS, K.P.; MILLER-MAIER, R.M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n.6, p. 3280-3287, 2003.

BRANNY, P.; PEARSON, J.P.; PESCI, E.C.; KÖHLER, T.; IGLEWSKI, B.H.; DELDEN, C.V. Inhibition of quorum sensing by a *Pseudomonas aeruginosa* *dkxA* homologue. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 5, p. 1531-1539, 2001.

BRINT J.M.; OHMAN, D.E. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. **J. Bacteriol.**, v. 177, n. 24, p. 7155-7163, 1995.

BURGER, A.E. Estimating the mortality of seabirds following oil-spills-effects of spill volume. **Mar. Poll. Bull.**, v. 26, p. 140-143, 1993.

BURGER, M.M.; GLASER, I.; BURTON, R.M. The enzymatic synthesis of a rhamnose-containing glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Biol. Chem.**, v. 238, p. 2595-2602, 1963.

BURNS, K.A., GARRITY, S.D., LEVINGS, S.C. How many years until mangrove ecosystems recover from catastrophic oil-spills. **Mar. Poll. Bull.**, v. 26, p. 239-248, 1993.

CAMPBELL, M.K. **Bioquímica**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora LTDA, 2000. 752p.

CHAPON-HERVE, V.; AKRIM, M.; LATIFI, A.; WILLIAMS, P.; LAZDUNSKI, A.; BALLY, M. Regulation of the *xcp* secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol. Microbiol.**, v. 24, p. 1169-1178, 1997.

CHONSSON, P.; LANAU, C.; CONNAN, J.; DESSERT, D. Biodegradation of refractory hydrocarbon biomarkers from petroleum under laboratory conditions. **Nature**, v. 351, p. 640-642, 1991.

CHUGANI, S.A.; WHITELEY, M.; LEE, K.M.; D'ARGENIO, D.; MANOIL, C.; GREENBERG, E.P. QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, n. 5, p. 2752-2757, 2001.

COOPER, D. J. Biosurfactants. **Microbiol. Sci.**, v. 3, p. 145-149, 1986.

COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface active agents from two *Bacillus* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, p. 224-229, 1987

COUTINHO, H.L.C.; OLIVEIRA, V.M.; MANFIO, G.P.; ROSADO, A.S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. **An. Acad. Bras. Ci.**, v. 71, n. 3, p. 491-503, 1999.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DIGGLE, S.P.; WINZER, K.; LAZDUNSKI, A.; WILLIAMS, P.; CÁMARA, M. Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of *N*-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. **J. Bacteriol.**, v. 184, n. 10, p. 2576-2586, 2002.

DÉZIEL E.; PAQUETTE, G.; VILLEMEUR, R.; LÉPINE, F.; BISAILLON, J.G. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 6, p. 1908-1912, 1996.

D'SOUZA, C.; NAKANO, M.M.; ZUBER, P. Identification of *comS*, a gene of the *srfA* operon that regulates the establishment of genetic competence in *Bacillus subtilis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, p. 9397-9401, 1994.

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

FISCHER, S.G.; LERMAN, L.S. DNA fragments differing by single basepair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 80, p. 1579-1583, 1983.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 92, p. 405-416, 2001.

FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. **Biotec. Ci. Desenvolv.**, v. 14, p. 12-16, 2000.

GAYLARD, C.C. Biodegradation of petrochemicals. In **EMBRAPA** (ed) Workshop sobre biodegradação. Campinas, SP, 1996. 255 p.

GIOVANNONI, S.J.; BRITSCHGI, T.B.; MOYER, C.L.; FIELD, K.G. Genetic diversity in Saragasso Sea bacterioplankton. **Nature**, v. 345, p. 60-63, 1990.

GUERRA-SANTOS; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose source. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 48, n. 2, p. 301-305, 1984.

GUTELL, R.R.; LARSEN, N.; WOESE, C.R. Lessons from a evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. **Microbial Rev.** v. 58, p. 10-26, 1994.

HANSEN, K.G.; DESAI, J.D.; DESAI, A.J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnol. Tech.**, v. 7, p. 745-748, 1993

HARRY, M.; GAMBIER, B.; BOUREZGUI, Y.; GARNIER-SILLAM, E. Evaluation of purification procedures for DNA extracted from organic rich samples: interference with humic substances. **Analisis**, v. 27, p. 439-442, 1999.

HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP, R.W. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecol.**, v. 35, p. 1-21, 1998.

HERMAN, D.C.; ARTIOLA, J.F.; MILLER, R.M. Removal of cadmium, lead, and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant. **Environ. Sci. Technol.** v. 29, n. 9, p. 2280-2285, 1995.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 18, p. 4765-4774, 1998.

JACOBSEN, C.S. Microscale detection of specific bacterial DNA in soil with a magnetic capture-hybridization and PCR amplification assay. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 9, p. 3347-3352, 1995.

JAIN, D.K.; THOMPSON, D.L.C.; LEE, H.; TREVORS, J.T. A drop-collapsing test for screening surfactant producing microorganisms. **J. Microbiol. Methods**, v. 13, p. 271-279, 1991.

JUCK, D.; CHARLES, T.; WHYTE, L.G.; GREER, C.W. Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. **FEMS. Microbiol. Ecol.**, v. 33, p. 241-249, 2000.

KARANTH, N.G.K.; DEO, P.G.; VEENANADIG, N.K. Microbial production of biosurfactants and their importance. **Curr. Sci. India**, v. 77, n. 1, p. 116-126, 1999.

KRSEK, M.; WELLINGTON, E.M.H. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. **J. Microbiol. Meth.**, v. 39, p. 1-16, 1999.

LAMBALOT, R.H.; GEHRING, A.M.; FLUGEL, R.S.; ZUBER, P.; LACELLE, M.; MARAHIEL, M.A.; REID, R.; KHOSLA, C.; WALSH, C.T. A new enzyme superfamily – the phosphopantetheinyl transferase. **Chem. Biol.**, v. 3, p. 923-936, 1996.

LEAHY, J.G., COLWELL, R.R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. **Microbiol. Rev.**, v. 54, p. 305-315, 1990.

LI, G.; HUANG, W.; LERNER, D.N.; ZHANG, X. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. **Wat. Res.**, v. 34, n. 15, p. 3845-3853, 2000.

LUZ, W.C. Classificação dos seres vivos para o novo milênio. Parte I – o sistema e 25 reinos em três domínios. **RAPP**. v. 8, p. 1-25, 2000.

MADIGAN, M.T. Microbial genetics. **Brock biology of microorganisms**. 9^a ed. New Jersey: Prentice Hall, 2000. 991 p.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An uptake on the use of unconventional substrates for biosurfactant prouction and their new applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.58, p. 428-434, 2002.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.

MATSUYAMA, T.; SOGAWA, M.; YANO, I. Direct colony thin-layer chromatography and rapid characterization of *Serratia marcescens* mutants defective in production of wetting agents. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, p. 1186-1188, 1987.

MEDINA, G.; JUÁREZ, K.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. The *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* operon is not expressed during the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhlR and the autoinducer *N*-butyryl-hemoserine lactone. **J. Bacteriol.**, v. 185, n. 1, p. 377-380, 2003.

MEYERS, R.M.; TESKE, S.G.; WIRSEN, C.O.; JANNASCH, H.W. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Res.**, v. 13, p. 3131-3145, 1985.

MILLER, R.M.; ZHANG, Y. Measurement of biosurfactant-enhanced solubilization and biodegradation of hydrocarbons. **Methods Biotechnol.**, v. 2, p. 59-66, 1997.

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, n. 11, p. 3016-3019, 1989.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Anton. Leeuw. Int. J.G.**, v. 73, p. 127-141, 1998.

NAHUM, L.A. Evolução dos genomas. In: MATIOLI, S.R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, Editora, 2001. p. 82-96.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Quim. Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NOORDMAN, W.H.; JANSSEN, D.B. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 9, p. 4502-4508, 2002.

OSCHNER, U.A.; FIECHTER, A.; REISER, J. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 31, p. 19787-19795, 1994.

OSCHNER, U.A.; REISER, J. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 6424-6428, 1995.

OSTERREICHER-RAVID, D.; RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Horizontal transfer of an exopolymer complex from one bacterial species to another. **Environ. Microbiol.**, v. 2, n. 4, p. 366-372, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D.A. New developments in solid-state fermentation: I – bioprocesses and products. **Process Biochem.** v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PEARSON, J.P. Early activation of quorum sensing. **J. Bacteriol.**, v. 184, n. 10, p. 2569-2571, 2002.

PEARSON, J.P.; GRAY, K.M.; PASSADOR, L.; TUCKER, K.D.; EBEHARD, A.; IGLEWSKI, B.H.; GREENBERG, E.P. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 197-201, 1994.

PEARSON, J.P.; PESCI, E.C.; IGLEWSKI, B.H. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing system in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. **J. Bacteriol.** v. 179, n. , p. 5756-5767, 1997.

PESCI, E.C.; PEARSON, J.P.; SEED, P.C.; IGLEWSKI, B.H. Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 179, n. 10, p. 3127-3132, 1997.

PESSI, G.; WILLIAMS, F.; HINDLE, Z.; HEURLIER, K.; HOLDEN, M.T.G; CÁMARA, M.; HAAS, D.; WILLIAMS, P. The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and *N*-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 22, p. 6676-6683, 2001.

RAHIM, R.; OSCSNER, U.A.; OLVERA, C.; GRANINGER, M.; MESSNER, P.; LAM, J.S.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. **Mol. Microbiol.**, v. 40, n. 3, p. 708-718, 2001.

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

RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environ. Microbiol.**, v. 3, n. 4, p. 229-236, 2001.

RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 13, p. 249-252, 2002

ROOSE-AMSALEG, C.L.; GARNIER-SILLAM, E.; HARRY, M. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. **Appl. Soil Ecol.**, v. 18, p. 47-60, 2001.

ROSATO, B.Y. Biodegradação do petróleo. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: Embrapa – CNPMA, 1997. p.307-334.

ROSENBERG, E. Microbial surfactants. **Crit. Ver. Biotech.** V. 3, p. 109-132, 1986.

SANDRIN, T.R.; CHECHI, A.M.; MAIER, R.M. A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 10, p. 4585-4588, 2000.

SANTA ANNA, L.M.; SEBASTIAN, G.V.; MENEZES, E.P.; ALVES, T.L.M.; SANTOS, A.S.; PEREIRA Jr, N.; FREIRE, D.M.G. Production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. **Braz. J. Chem. Eng.** v. 19, n. 2, p. 159-166, 2002.

SEABRA, P.N. Uso da biorremediação em áreas impactadas pela indústria de petróleo. In MELO, I.S.; SILVA, C.M.M.S.; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. **Biodegradação**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001. p. 41-59.

SHULGA, A.N.; KARPENKO, E.V.; ELISEEV, S.A.; TUROVSKY, A.A. The method for determination of anionogenic bacterial surface active peptidolipids. **Microbiol. J.**, v. 55, p. 85-88, 1993.

SIEGMUND, I.; WAGNER, F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species grown on mineral agar. **Biotechnol. Tech.**, v. 5, p. 265-268, 1991.

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J. **Fundamentos de Genética**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2001. 756p.

SOLOMON, J.M.; GROSSMAN, A.D. Who's competent and when: regulation of natural competence in bacteria. **Trends Genet.**, v. 12, n. 4, p. 150-155, 1996.

SULLIVAN, E.R. Molecular genetics of biosurfactant production. **Curr. Opin. Biotech.**, v. 9, p. 263-269, 1998.

STACHELHAUS, T.; MARAHIEL, M.A. Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. **FEEMS Microbiol. Lett.**, v. 125, p. 3-14, 1995.

TESKE, A.; SIGALEVICH, P.; COHEN, Y.; MUYZER, G. Molecular identification of bacteria from a coculture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments as a tool for isolation in pure cultures. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.62, n. 11, p. 4210-4215, 1996.

TREVORS, J.T.; VAN ELSAS, JD. A review of selected methods in environmental microbial genetics. **Can. J. Microbiol.**, v. 35, p. 895-902.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J. & DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 782-787, 1990.

TSAI, Y.; OLSON, B.H. Rapid method for direct extraction of DNA from seeded soils. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, p.1070-1074, 1991.

VAN DER PEER, Y.; CHAPPELLE, S.; WACHTER, R. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 24, n. 17, p.3381-3391, 1996.

VAN DER VEGT, W.; VANDER MEI, H.C.; NOORDMANS, J.; BUSSCHER, H.J. Assessment of bacterial biosurfactant production through axisymmetric drop shape analysis by profile. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 35, p. 766-770, 1991.

WINSON, K.M.; CAMARA, M.; LATIFI, A.; FOGILINO, M.; CHHABRA, S.R.; DAYKIN, M.; BALLY, M.; CHAPON, V.; SALAMOND, G.P.C.; BYCROFT, B.W.; LAZDUNSKI, A.; STEWART, G.S.A.B.; WILLIAMS, P. Multiple *N*-acyl-L-

hemoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 9427-9431, 1995.

WHITELEY, M.; LEE, K.M.; GREENBERG, E.P. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n. 24, p. 13904-13909, 1999.

WHITELEY, M.; PARSEK, M.R.; GREENBERG, E.P. Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 15, p. 4356-4360, 2000.

WHEELIS, M.L.; KANDLER, O.; WOESE, C.R. On the nature of global classification. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 2930-2934, 1992.

WOESE, C.R. The universal ancestor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 6854-6859, 1998.

YAKIMOV, M.M.; GOLYSHIN, P.N. ComA-dependent transcriptional activation of lichenysin A synthetase promoter in *Bacillus subtilis* cells. **Biotechnol Prog.**, v. 13, p. 757-761, 1997.

YAMAGUCHI, M.; SATOMI, A.; YUKUYAMA, A. Microbial production of sugar lipids. **Chem. Ind.**, v. 17, p. 741-742, 1976.

YOUSSEF, N.H.; DUNCAN, K.E.; NAGLE, D.P.; SAVAGE, K.N.; KNAPP, R.M.; Mc INERNEY, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **J. Microbiol. Meth.**, v. 56, p. 339-347, 2004.

ZHANG, Y.; MILLER, R.M. Effect rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of *n*-alkanes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 6, p. 2247-2251, 1995

ZHOU, J.; BRUNS, M.A.; TIEDJE, J.M. DNA recovery from soils of diverse composition. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 2, p.316-322, 1996.