

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**BIODEGRADAÇÃO DA FRAÇÃO BTX E ETANOL DA  
GASOLINA COMERCIAL E DA GASOLINA PURA POR  
MICROORGANISMOS ISOLADOS DE LOCAIS IMPACTADOS**

Daiana de Lima Morales  
Bióloga - PUCRS

Maio, 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**BIODEGRADAÇÃO DA FRAÇÃO BTX E ETANOL DA  
GASOLINA COMERCIAL E DA GASOLINA PURA POR  
MICROORGANISMOS ISOLADOS DE LOCAIS IMPACTADOS**

Daiana de Lima Morales  
Bióloga - PUCRS

Dissertação apresentada como um dos requisitos para a obtenção do Grau de  
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, RS, Brasil  
Maio de 2008



**“Ela acreditava em anjo, e porque acreditava, eles existiam”  
(A Hora da Estrela)**

**Clarice Lispector**

## AGRADECIMENTOS

À Dr. Fátima Menezes Bento pela orientação, amizade, alegria e incentivo durante todas as etapas deste trabalho e além disso, pelo apoio e confiança em meus sonhos profissionais.

À Dr. Maria do Carmo Peralba, pelas análises cromatográficas, atenção, paciência e interesse pelo trabalho.

Aos colegas Rodrigo Jacques, Luiz Roesch, Lucas de David, pela amizade, ensinamentos e ajuda durante algumas etapas deste trabalho e especialmente à Cátia Passos, Núbia Oliveira e Márcia Weissheimer, minhas queridas amigas que me emprestaram muito do seu conhecimento e tempo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas da Agronomia, que se tornaram meus amigos ao longo destes dois anos, Andréa, Andressa, Kelly, Dani Blu, Dani, Patrícia, Regilene, Analú, Elizangela, Aline, Leandro, Robson e Simone.

Aos amigos e professores que me apresentaram a microbiologia: Ms. Alessandra Einsfeld, Dr. Gertrudes Corção, Dr. Silvia de Oliveira; Dr. Carla Lange; Dr. Mercedes Geimba e Ricardo Casanova.

Aos queridos professores e colegas do Departamento de Microbiologia pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Aos professores e funcionários do PPG Ciência do Solo, especialmente ao Dr. Flávio Camargo, pela colaboração durante o andamento deste trabalho.

Às minhas amigas do coração, pelo carinho, risadas, festas, telefonemas, encontros e longas conversas.

Aos meus amados pais, Luiz Carlos e Nilza Catarina, pelo amor e estímulo a minha carreira profissional. Ao meu pequeno irmãozinho, Gabriel, por ser a “alegria da casa”. À minha irmã, Jucéli, melhor amiga e eterno exemplo. Ao meu querido cunhado, Rodrigo, pela amizade e mil e um favores com o computador. Ao Cuco, por ser o amor da minha vida. A toda a minha família pela nossa alegre, afetuosa e pacífica convivência.

Às empresas COPESUL e GEOCLOCK que gentilmente nos receberam e forneceram amostras.

Ao CNPq e à CAPES pelo investimento.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao PPG Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela oportunidade de realização do mestrado.

# BIODEGRADAÇÃO DA FRAÇÃO BTX E ETANOL DA GASOLINA COMERCIAL E DA GASOLINA PURA POR MICRORGANISMOS ISOLADOS DE LOCAIS IMPACTADOS<sup>1</sup>

Autor: Daiana de Lima Morales  
Orientador: Fátima Menezes Bento

## Resumo

A gasolina comercial é formada por uma mistura de diversos hidrocarbonetos sendo que a fração aromática, conhecida como os BTX, e apresenta risco potencial a saúde humana. A gasolina comercial brasileira contém 24% de etanol, este aditivo pode interferir na degradação destes compostos que são mais recalcitrantes e tóxicos. Devido a característica hidrofóbica da gasolina os biossurfactantes, podem aumentar a disponibilidade destes poluentes, possibilitando maior taxa de biodegradação. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar uma população microbiana, isolada de locais contaminados por hidrocarbonetos, avaliando a produção de biossurfactantes e a degradação do etanol e fração BTX, presentes na gasolina comercial e gasolina pura. Foi realizado o isolamento e seleção preliminar dos microrganismos produtores de biossurfactantes (medidas de tensão superficial, IE 24% e teste colorimétrico) e avaliação do crescimento em gasolina e derivados (meio mineral e gasolina comercial, gasolina pura e fração BTX (P.A)). A análise da degradação foi realizada por cromatografia gasosa. A produção de biossurfactantes foi verificada em diferentes meios de cultura e foi extraído e quantificado o ramnolipídeo produzido. Foram isolados 131 microrganismos, dois se destacaram dos demais. A cepa *P. aeruginosa* UFRGS38, produziu 5,9 g/L de ramnolipídeos, reduziu a medida de tensão superficial de 42,8 para 33,2 mN/m, obteve I.E 24% de 53 % e atingiu a CMC em 1,1 mg/L. O isolado *B. vietnamiensis* UFRGS62, degradou: 52% do etanol, 50% do benzeno, 48% do tolueno, 36% do *m*-xileno, 30% do *p*-xileno e 48% do *o*-xileno, em meio contendo, meio mineral, gasolina comercial e 0,2% de glicose.

---

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia Ambiental, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (149 p.) Maio, 2008.

# BIODEGRADATION OF BTX AND ETHANOL FRACTION OF COMMERCIAL GASOLINE AND REGULAR GASOLINE BY MICROORGANISMS OBTAINED FROM POLLUTED PLACES<sup>2</sup>

Author: Daiana de Lima Morales  
Supervisor: Fátima Menezes Bento

## Abstract

The commercial gasoline is constituted by a mixture of many hydrocarbons, the aromatic fraction, known as BTX, presents risk to human health. The Brazilian commercial gasoline contains 24% of ethanol, this additive may interfere in the degradation of these compounds, that are recalcitrant and toxic. Due to gasoline hydrophobic characteristic, the biosurfactant can improve the bioavailability of these pollutants, enhanced their biodegradation. The object of this research was to isolate and characterize the microbial population from hydrocarbon contaminated sites, making an assessment about the biosurfactant production and the degradation of ethanol and BTX fraction, components of commercial gasoline and regular gasoline. A screening was made to select biosurfactant producers (surface tension, IE 24% and colorimetric assay) and an assessment of the growing capacity in gasoline and derivatives (mineral salts medium with commercial gasoline, regular gasoline and BTX (P.A)). The degradation was determined by gas chromatography. Different culture mediums were screened for biosurfactant production. The rhamnolipid produced was extracted and quantified. From the 131 microorganisms obtained, two were chosen to the next experiments. *P. aeruginosa* UFRGS38 strain, showed yield of 5,9 g/L of rhamnolipid production, reduced the surface tension from 42,8 to 33,2 mN/m, the emulsifying capacity was 53 % and the CMC was 1,1 mg/L. *B. vietnamiensis* UFRGS62 strain degraded: 52% of the ethanol, 50% of the benzene, 48% of the toluene, 36% of the *m*-xylene, 30% of the *p*-xylene e 48% of the *o*-xylene, in mineral salts medium, containing commercial gasoline and 0,2% of glucose.

---

<sup>2</sup>Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (149 p.) Maio, 2008.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1 Gasolina comercial</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1.1 Toxicidade (BTX)</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2 Riscos Ambientais</b> .....	<b>7</b>
<b>2.2.1 Interações entre etanol e BTX</b> .....	<b>9</b>
<b>2.3 Remediação</b> .....	<b>11</b>
<b>2.4 Degradação</b> .....	<b>13</b>
<b>2.5 Biossurfactantes</b> .....	<b>17</b>
<b>2.5.1 Métodos de detecção</b> .....	<b>18</b>
<b>2.5.1.1 Concentração Micelar Crítica (CMC)</b> .....	<b>22</b>
<b>2.5.2 Influência na degradação de hidrocarbonetos</b> .....	<b>22</b>
<b>2.5.3 Ramnolipídeos</b> .....	<b>24</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1. Isolamento de microrganismos degradadores de gasolina</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1.1 Coleta</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1.2 Combustíveis e hidrocarbonetos aromáticos</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1.3 Frascos</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1.4 Isolamento de microrganismos degradadores de gasolina comercial</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2 Preparo do pré-inóculo</b> .....	<b>31</b>
<b>3.3 Avaliação da capacidade de degradação preliminar da gasolina e derivados</b> .....	<b>32</b>
<b>3.3.1 Gasolina comercial e gasolina pura</b> .....	<b>32</b>
<b>3.3.2 Fração BTX</b> .....	<b>33</b>
<b>3.4 Avaliação da capacidade de produção de biossurfactantes</b> .....	<b>33</b>
<b>3.4.1 Tensão superficial</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4.2 Índice de emulsificação</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4.3 Teste colorimétrico</b> .....	<b>35</b>
<b>3.5 Análise da cinética de crescimento e produção de biossurfactantes</b> .....	<b>35</b>
<b>3.6 Interações entre microrganismos</b> .....	<b>36</b>



<b>3.6.1 Identificação dos isolados</b> .....	<b>37</b>
<b>3.6.1.1 Extração do DNA</b> .....	<b>37</b>
<b>3.6.1.2 Sequenciamento da região 16S</b> .....	<b>38</b>
<b>3.7 Análise da degradação dos hidrocarbonetos</b> .....	<b>38</b>
<b>3.7.1 Cromatografia gasosa</b> .....	<b>39</b>
<b>3.7.2 Faixa de linearidade</b> .....	<b>40</b>
<b>3.8 Produção de biossurfactantes</b> .....	<b>40</b>
<b>3.8.1 Teste com diferentes meios para produção de ramnolipídeos</b> .....	<b>40</b>
<b>3.8.2 Extração do ramnolipídeo</b> .....	<b>41</b>
<b>3.8.3 Quantificação do ramnolipídeo</b> .....	<b>42</b>
<b>3.8.4 Concentração Micelar Crítica (CMC)</b> .....	<b>42</b>
<b>3.9 Degradação com adição de 0,1% de extrato de levedura e 0,2% de glicose</b> ....	<b>43</b>
<b>3.10 Análise estatística</b> .....	<b>43</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>44</b>
<b>4.1 Coleta e isolamento</b> .....	<b>44</b>
<b>4.2 Avaliação da capacidade de degradação preliminar da gasolina e derivados</b> .....	<b>45</b>
<b>4.3 Avaliação da capacidade de produção de biossurfactantes</b> .....	<b>51</b>
<b>4.4 Análise da cinética de crescimento e produção de biossurfactantes</b> .....	<b>58</b>
<b>4.5 Interações entre microrganismos</b> .....	<b>66</b>
<b>4.5.1 Identificação molecular dos isolados</b> .....	<b>72</b>
<b>4.6 Análise da degradação dos hidrocarbonetos</b> .....	<b>73</b>
<b>4.6.1 Gasolina comercial e gasolina pura</b> .....	<b>74</b>
<b>4.6.2 BTX (P.A)</b> .....	<b>81</b>
<b>4.6.3 Degradação com adição de extrato de levedura e de glicose</b> .....	<b>86</b>
<b>4.7 Produção de biossurfactantes</b> .....	<b>88</b>
<b>4.7.1 Teste com diferentes meios para produção de ramnolipídeos</b> .....	<b>89</b>
<b>4.7.2 Extração do ramnolipídeo</b> .....	<b>100</b>
<b>4.7.3 Quantificação do ramnolipídeo</b> .....	<b>101</b>
<b>4.7.4 Concentração Micelar Crítica (CMC)</b> .....	<b>102</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>106</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>107</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>118</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Avaliação preliminar das fontes de carbono utilizadas pelos isolados: gasolina comercial, gasolina pura, benzeno, tolueno e xilenos, em meio mineral e TTC, durante 72 horas, a 30°C. As células assinaladas com um X indicam que o isolado, utilizou esta fonte de carbono. A ultima coluna à direita, mostra a origem do isolado, *landfarming* (L) ou posto de combustíveis (PC).....49
- Tabela 2.** Avaliação preliminar da produção de biossurfactantes. Tensão superficial em mN/m (TS), emulsificação da gasolina utilizando a cultura (EC/) e o sobrenadante (ES) e teste colorimétrico (TC). Para as medidas da tensão superficial e emulsificação, foram empregadas culturas onde a única fonte de carbono presente era a gasolina comercial, incubadas durante 72 horas, a 30°C. A ultima coluna à direita, mostra a origem do isolado, *landfarming* (L) ou posto de combustíveis (PC).....53
- Tabela 3.** Crescimento celular e medida da tensão superficial dos consórcios (isolado capaz de crescer em todos os substratos e *P. aeruginosa* UFRGS38 produtor de ramnolipídeos) em meio mineral suplementado com 1% de gasolina comercial, após 72 horas de incubação.....70
- Tabela 4.** Degradação em percentual da gasolina comercial pelos isolados produtores de biossurfactantes (*P. aeruginosa* UFRGS38, UFRGS95, UFRGS96, UFRGS97, UFRGS98, UFRGS101, UFRGS103, UFRGS123 e UFRGS128) em meio mineral durante 72 horas.....77
- Tabela 5.** Degradação em percentual da gasolina comercial e gasolina pura pelos isolados *B. vietnamiensis* UFRGS62, UFRGS63 e *B. vietnamiensis* UFRGS68 em meio mineral durante 72 horas.....80
- Tabela 6.** Degradação em percentual dos hidrocarbonetos benzeno, tolueno e xilenos P.A (30 mg L<sup>-1</sup>) inoculados juntos pelos isolados *B. vietnamiensis* UFRGS62, UFRGS63 e *B. vietnamiensis* UFRGS68 em meio mineral durante 72 horas.....82
- Tabela 7.** Degradação em percentual dos hidrocarbonetos benzeno, tolueno e xilenos (50 mg L<sup>-1</sup>) inoculados individualmente pelo isolado *B. vietnamiensis* UFRGS62, em meio mineral durante 72 horas.....83
- Tabela 8.** Degradação em percentual da gasolina comercial pelos isolados *P. aeruginosa* UFRGS38 e *B. vietnamiensis* UFRGS62 em meio mineral suplementado com glicose (0,2%), durante 72 horas.....88

**Tabela 9.** Produção de biossurfactantes pelos isolados *P. aeruginosa* UFRGS38, UFRGS95, UFRGS97, *P. aeruginosa* UFRGS98, *P. aeruginosa* UFRGS103 e UFRGS123 em meio MSM + 2% Glicose, PPGAS, meio mineral com 1% de óleo de soja e 1% de diesel, durante 5 dias.....94

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura dos hidrocarbonetos aromáticos benzeno, tolueno e dos isômeros do xileno (Modificado de pt.wikipedia.org).....5
- Figura 2.** Pluma de gasolina comercial em água subterrânea, provocada por um vazamento em um tanque de combustíveis (Fonte: [http://www.sinmec.ufsc.br/sinmec/lab/jonas/modelo\\_hc.html](http://www.sinmec.ufsc.br/sinmec/lab/jonas/modelo_hc.html)).....9
- Figura 3.** Apresentação esquemática de algumas reações enzimáticas possíveis, durante a degradação dos hidrocarbonetos BTEX (modificado de Hendrickx et al., 2006).....14
- Figura 4.** Teste colorimétrico para os isolados UFRGS38, UFRGS95, UFRGS96, UFRGS97, UFRGS98, UFRGS101, UFRGS103, UFRGS123 e UFRGS128 com resultados positivos e UFRGS88 com resultado negativo. A inoculação foi realizada por picada e a incubação em estufa a 30 °C, por 72 horas.....58
- Figura 5.** Tempo de cultivo e detecção de biossurfactante em frascos hermeticamente fechados. Para o isolado UFRGS38. A curva de produção foi realizada em meio mineral com 1% de gasolina comercial, a 30°C por 72 horas, foram analisadas alíquotas a cada 6 horas. Símbolos: (□) Tensão superficial (mN/m); (•) Densidade ótica (600 nm).....62
- Figura 6.** Tempo de cultivo e detecção de biossurfactante em frascos hermeticamente fechados. Para o isolado UFRGS96. A curva de produção foi realizada em meio mineral com 1% de gasolina comercial, a 30°C por 72 horas, foram analisadas alíquotas a cada 8 horas. Símbolos: (□) Tensão superficial (mN/m); (•) Densidade ótica (600 nm).....62
- Figura 7.** Tempo de cultivo e detecção de biossurfactante em frascos hermeticamente fechados. Para o isolado UFRGS97. A curva de produção foi realizada em meio mineral com 1% de gasolina comercial, a 30°C por 72 horas, foram analisadas alíquotas a cada 8 horas. Símbolos: (□) Tensão superficial (mN/m); (•) Densidade ótica (600 nm).....63
- Figura 8.** Tempo de cultivo e detecção de biossurfactante em frascos hermeticamente fechados. Para o isolado UFRGS98. A curva de produção foi realizada em meio mineral com 1% de gasolina comercial, a 30°C por 72 horas, foram analisadas alíquotas a cada 8 horas. Símbolos: (□) Tensão superficial (mN/m); (•) Densidade ótica (600 nm).....63

- Figura 9.** Tempo de cultivo e detecção de biossurfactante em frascos hermeticamente fechados. Para o isolado UFRGS101. A curva de produção foi realizada em meio mineral com 1% de gasolina comercial, a 30°C por 72 horas, foram analisadas alíquotas a cada 8 horas. Símbolos: (□) Tensão superficial (mN/m); (•) Densidade ótica (600 nm).....64
- Figura 10.** Tempo de cultivo e detecção de biossurfactante em frascos hermeticamente fechados. Para o isolado UFRGS103. A curva de produção foi realizada em meio mineral com 1% de gasolina comercial, a 30°C por 72 horas, foram analisadas alíquotas a cada 8 horas. Símbolos: (□) Tensão superficial (mN/m); (•) Densidade ótica (600 nm).....64
- Figura 11.** Tempo de cultivo e detecção de biossurfactante em frascos hermeticamente fechados. Para o isolado UFRGS123. A curva de produção foi realizada em meio mineral com 1% de gasolina comercial, a 30°C por 72 horas, foram analisadas alíquotas a cada 6 horas. Símbolos: (□) Tensão superficial (mN/m); (•) Densidade ótica (600 nm).....65
- Figura 12.** Resultados para o controle no ensaio avaliando: tempo de cultivo e detecção de biossurfactante em frascos hermeticamente fechados. A curva de produção foi realizada em meio mineral com 1% de gasolina comercial, a 30°C por 72 horas, foram analisadas alíquotas a cada 8 horas. Símbolos: (□) Tensão superficial (mN/m); (•) Densidade ótica (600 nm).....65
- Figura 13.** Tempo de cultivo e detecção de ramnolípido para o isolados *P. aeruginosa* 38. A curva de produção foi realizada em meio MSM + 2% Glicose (A) e meio PPGAS (B), a 30 °C por 7 dias. Alíquotas foram analisadas a cada 24 horas. Símbolos: (•) Tensão superficial (mN/m); (□) Densidade ótica (600 nm); (barra vertical com listras) emulsificação da cultura com células; (barra vertical cinza) emulsificação com sobrenadante.....97
- Figura 14.** Efeito do aumento da concentração de ramnolípido na tensão superficial. As soluções de ramnolípido foram preparadas em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 (A e B). Gráfico exibindo linhas de tendência (B). A intersecção das linhas de tendência indica o ponto estimado da CMC..... 103

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BTX</b>	Benzeno, Tolueno e Xileno
<b>BTXE</b>	Benzeno, Tolueno, Xileno e Etilbenzeno
<b>ANP</b>	Agência Nacional do Petróleo
<b>EPA-USA</b>	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
<b>NAPL</b>	Fase Líquida não aquosa
<b>CETESB</b>	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental ligada a Secretaria do Meio Ambiente do Governo do Estado de São Paulo
<b>PHAs</b>	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
<b>CMC</b>	Concentração Micelar Crítica
<b>LPS</b>	Camada Lipopolissacarídeos
<b>SITEL</b>	Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes
<b>REFAP</b>	Refinaria Alberto Pasqualini
<b>COPEL</b>	Companhia Petroquímica do Sul
<b>TTC</b>	Indicador Redox Cloreto de Trifeniltetrazólio
<b>TPF</b>	Trifenil Formazan
<b>P. A</b>	Para Análise
<b>PCR</b>	reação em cadeia da polimerase
<b>PPGAS</b>	Meio de cultura com Proteose, Fosfato-Limitado, Peptona, Glicose (0,5%), Sais de Amônia
<b>MSM</b>	Meio de cultura com Ácido Fosfórico (85%), Glicose (2%) e Sais Minerais
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônia
<b>MTBE</b>	Metil t-butil éter
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sódio
<b>PCBs</b>	Bifenilas Policloradas

## 1. INTRODUÇÃO

A gasolina comercial é formada por uma mistura de diversos hidrocarbonetos do petróleo. Alguns constituintes desta mistura, especialmente a fração aromática, benzeno, tolueno e xilenos (BTX), apresentam risco potencial a saúde humana, sendo considerados agentes carcinogênicos. Portanto, sua presença no meio ambiente deve ser controlada.

As principais fontes de contaminação por gasolina são originadas em postos de combustíveis. Estas contaminações são provenientes de práticas profissionais inadequadas, derrames acidentais e principalmente devido a vazamentos de tanques antigos de armazenamento de combustíveis. Estes reservatórios foram enterrados no solo, e tratando-se de tanques antigos, nenhuma proteção do tanque ou impermeabilização do terreno foi no passado conduzida e tampouco exigida por Órgãos Ambientais. Neste sentido, os vazamentos estão ocorrendo por ocasião da corrosão externa e interna destes tanques, permitindo que o combustível atinja o solo, o subsolo e podendo percolar até o lençol freático, atingindo as águas subterrâneas. O estado de São Paulo através da Companhia Estadual de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) divulgou um levantamento sobre atividades poluidoras, em novembro de 2006, mostrando que os

postos de combustíveis contribuem com 74% (1.352 casos) no número total de áreas contaminadas registradas naquele estado por esta atividade.

A degradação natural ocorre por uma grande variedade de microrganismos capazes de degradar os hidrocarbonetos encontrados na gasolina. A biorremediação que é uma forma de descontaminar ambientes impactados com poluentes, consegue através da competência fisiológica de microrganismos (bactérias e fungos), disponibilizar o contaminante e degrada-lo, transformando-o em uma moléculas inofensivas, como o dióxido de carbono e a água (mineralização).

Na composição da gasolina comercial, estão presentes desde hidrocarbonetos alifáticos de fácil degradação, até compostos mais recalcitrantes, como os hidrocarbonetos aromáticos (BTX). Portanto, os microrganismos com potencial enzimático para metabolizar a gasolina, podem optar pela degradação das frações menos recalcitrantes, como o etanol, podendo causar acúmulo das frações aromáticas no ambiente. Desta forma, um estudo detalhado da degradação de uma mistura de hidrocarbonetos complexa como a gasolina comercial brasileira, é muito importante.

Alguns componentes da gasolina podem ser pouco solúveis, o que resulta em baixa biodisponibilidade dos poluentes aos microrganismos. Para superar esta limitação, os microrganismos podem produzir biossurfactantes, que são moléculas constituídas de uma fração polar e uma apolar, que aumentam a disponibilidade dos hidrocarbonetos apolares. Devido a esta característica, os biossurfactantes são capazes de reduzir a tensão superficial do meio aquoso e formar emulsões estáveis entre líquidos de duas fases, como a água e a gasolina.



A síntese de biossurfactantes normalmente está relacionada ao aumento da biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos, no entanto, pode conferir aos microrganismos outros benefícios. Além disso, de acordo com a literatura, os biossurfactantes são importantes, para a movimentação celular, comunicação célula-célula e atividade antimicrobiana.

As áreas com histórico de contaminação com hidrocarbonetos selecionam microrganismos, tornando-se locais com uma população autóctone com características peculiares. Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram: isolar e caracterizar microrganismos quanto a capacidade de degradação e produção de biossurfactantes de locais contaminados com hidrocarbonetos, avaliar a degradação preferencial do etanol e da fração BTX, presentes na gasolina comercial (24% de álcool) e gasolina pura; caracterizar ao nível de espécie os microrganismos selecionados e selecionar meios de cultura visando a produção de biossurfactantes.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

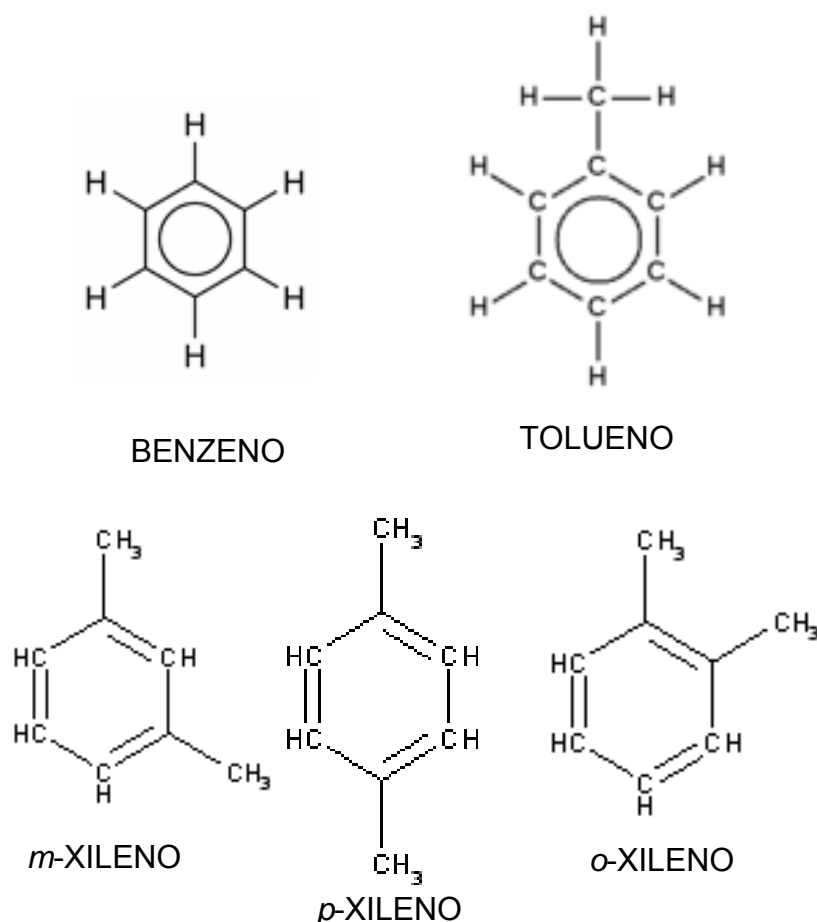
### 2.1 Gasolina comercial

A gasolina é um derivado do petróleo formado por uma mistura de diversos tipos de hidrocarbonetos: parafínicos (cadeias retilíneas com ligações simples), naftalênicos (cadeias fechadas com ligações simples), aromáticos (cadeia fechada) e mistos, com 4 à 13 átomos de carbono. No total, a gasolina pode apresentar mais de 150 compostos, cuja faixa de destilação varia de 30 a 220 °C (Cunha, 1996).

No Brasil é utilizada uma gasolina única, pois se trata de uma mistura de 76% de gasolina e 24% de álcool etílico (etanol). O teor de álcool na gasolina é especificado pela Agência Nacional do Petróleo – ANP, e é objeto de lei federal.

Uma das desvantagens relacionadas à adição de etanol à gasolina, é o impacto negativo na biodegradação natural dos constituintes deste combustível, em solo e águas subterrâneas contaminadas (Deeb et al., 2002).

Alguns constituintes da gasolina como benzeno, tolueno, xileno e etilbenzeno, fração aromática, chamados compostos BTXE (Figura 1), são considerados carcinogênicos, portanto um dos maiores problemas de contaminação por gasolina está relacionado a estes hidrocarbonetos. Os compostos aromáticos BTX e outros alquilbenzenos, perfazem cerca de 10% a 59% da gasolina, enquanto que os hidrocarbonetos alifáticos compreendem 41% a 62% (Tiburtius et al., 2004).



**Figura 1.** Estrutura dos hidrocarbonetos aromáticos benzeno, tolueno e dos isômeros do xileno (Modificado de pt.wikipedia.org)

### 2.1.1 Toxicidade (BTX)

Os hidrocarbonetos aromáticos são mais tóxicos que os compostos alifáticos com o mesmo número de carbonos e possuem maior mobilidade em água, em função de sua solubilidade ser da ordem de 3 a 5 vezes maior (Tiburtius et al., 2004). Devido a estas características, estes compostos, são classificados como poluentes prioritários, pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) (Otenio et al., 2005).

Aproximadamente de 15 a 20 inalações de petróleo podem produzir: euforia, ataxia e desorientação que podem durar por mais de 6 horas. Muitos dos efeitos agudos da inalação do petróleo são atribuídos a ação dos hidrocarbonetos voláteis, como o benzeno, *n*-hexano, *n*-pentano, tolueno e xilenos (Senzolo et al., 2000; Cairney et al. 2002). Quando estes voláteis são inalados, uma pequena fração é exalada no ar sem alteração, e o resto é convertido em metabólitos hidrofílicos antes de ser excretado na urina. A meia vida destes metabólitos no corpo pode alcançar 7,5 horas para o tolueno e de 9 a 24 horas para o benzeno (Cairney et al. 2002).

As intoxicações causadas pela inalação de petróleo e seus derivados incluem agitação, aumento da libido, relaxamento, comportamento agressivo e raiva. Também são observados sintomas semelhantes aos provocados pelo consumo de álcool etílico como: pronúncia confusa das palavras; andar cambaleante; impulsividade e conduta desinibida. Doses maiores podem induzir a alucinações, delírios, inconsciência, ataques e até mesmo coma (Cairney et al. 2002).

Segundo as normas do Ministério da Saúde (Portaria 1.469/2000) as concentrações limites para potabilidade da água dos compostos BTXE são: xileno  $300 \mu\text{g L}^{-1}$ , etilbenzeno  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ , tolueno  $170 \mu\text{g L}^{-1}$  e somente  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  para o benzeno. De acordo com a classificação da EPA o benzeno é um composto muito perigoso, pertencendo ao grupo 1: conhecido carcinógenos humanos. A toxicidade do benzeno resulta da biotransformação de alguns compostos em espécies reativas, como a mielotoxicidade e a genotoxicidade, decorrente de uma combinação sinérgica entre o fenol, hidroquinona, muconaldeído e catecol (Senzolo et al., 2000).

Este hidrocarboneto está associado ao câncer de pulmão, já que o órgão desempenha um importante papel no seu metabolismo, e conseqüentemente na sua toxicidade (Powley & Carlson, 1999).

A inalação de tolueno está associada a sintomas de síndrome neuronal, (ex: convulsões), déficit cognitivos (ex: apatia), falta de atenção e memória. Também pode causar sintomas de euforia, como risadas, alternada a crises de choro, confusão e até mesmo alucinações (Raikhlin-Eisenkraft et al., 2001).

Benzeno, tolueno, xilenos e etilbenzeno, são os maiores componentes aromáticos do petróleo eles são amplamente utilizados na indústria de solventes para síntese orgânica, limpeza de equipamentos e outros diversos procedimentos industriais. São freqüentemente encontrados em águas subterrâneas como resultados de: práticas de armazenamento impróprias, derramamentos acidentais, vazamentos em aterros ou em tanques de armazenamento subterrâneos e oleodutos (Shim et al., 2002). O contato destes poluentes com o meio ambiente pode resultar em problemas futuros, caso estes entrem na cadeia alimentar através do solo ou reservatórios de água potável contaminados.

## **2.2 Riscos Ambientais**

A contaminação de águas subterrâneas por vazamentos de hidrocarbonetos ou outros poluentes, de tanques de armazenamento no subsolo, sistemas de distribuição e várias operações industriais é um dos principais problemas ambientais atuais (Diels, 2007).

Durante vazamentos acidentais, ações podem ser tomadas para a remoção do contaminante ou remediação ou recuperação imediata do poluente, enquanto que em postos de gasolina, a contaminação ocorre, devido a pequenos orifícios ou rachaduras que provocam um vazamento pequeno, mas contínuo e prolongados. Devido a esta persistência, as chances de contaminação de águas subterrâneas podem ocorrer (Rahman, et al., 2002).

Em alguns casos, a gasolina se espalha horizontalmente em função da composição do solo e do volume de combustível derramado, em outros o vazamento provoca infiltração vertical do combustível, podendo atingir o lençol freático. Uma boa parte da gasolina fica adsorvida a matéria orgânica do solo, dificultando a extração física. Estes compostos desorvem vagarosamente e atingem o lençol freático, promovendo ao longo do tempo, níveis consideráveis de contaminação (Cunha, 1996).

Por ser pouco solúvel em água, a gasolina derramada, contendo mais de uma centena de componentes, inicialmente estará presente no subsolo como líquido de fase não aquosa (NAPL), formando uma pluma de contaminação (Corseuil & Marins, 1997). A fração que atinge a zona de saturação do solo se apresenta sob duas formas: a fração hidrofílica, que se dissolve na água (a solubilidade da gasolina na água se encontra na faixa de 20 a 80 mg L<sup>-1</sup>) e a fração hidrofóbica que por ser menos densa que a água, fica localizada na superfície do lençol, formando a chamada pluma de contaminação (Cunha, 1996) (Figura 2).



**Figura 2.** Pluma de gasolina comercial em água subterrânea, provocada por um vazamento em um tanque de combustíveis (Fonte: [http://www.sinmec.ufsc.br/sinmec/lab/jonas/modelo\\_hc.html](http://www.sinmec.ufsc.br/sinmec/lab/jonas/modelo_hc.html)).

### 2.2.1 Interações entre etanol e BTXE

As interações entre o etanol e os compostos BTXE podem causar um comportamento completamente diferente no deslocamento da pluma do que aquele observado com gasolina sem álcool (Deeb et al., 2002).

A solubilidade efetiva em água de um composto orgânico particular presente na gasolina ou em uma mistura de líquidos de fase não aquosa (NAPL), poderá aumentar se forem adicionados compostos oxigenados tais como álcoois e éteres. Quando ocorrem vazamentos dos tanques de armazenamento e a gasolina entra em contato com a água, o álcool existente neste combustível, sendo completamente miscível em água, formará uma pluma de contaminação na água subterrânea. Portanto, uma alta concentração de etanol na água pode facilitar a transferência dos BTXE presentes na gasolina para a fase aquosa, aumentando a solubilidade destes, processo este denominado efeito de co-solvencia (Corseuil & Marins, 1998).

Se a pluma de contaminação atingir o lençol freático, esta irá se deslocar e será atenuada por diluição, dispersão, adsorção, volatilização e biodegradação, que é o único destes mecanismos que transforma os contaminantes em compostos inócuos a saúde. Uma vez que a biodegradação é o principal mecanismo de transformação dos hidrocarbonetos de petróleo, a determinação da taxa de transformação é de grande importância para se prever até onde a pluma irá se deslocar. Quando a taxa de biodegradação for igual ou maior que a taxa de deslocamento dos contaminantes a pluma deixará de se deslocar e diminuirá de tamanho (Corseuil & Marins, 1997). No entanto, se o processo natural de atenuação não evitar o deslocamento da pluma até locais de risco, tecnologias que acelerem a transformação dos contaminantes deverão ser implementadas (Corseuil & Marins, 1997).

Dados da CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo) revelaram, em novembro de 2006, no Estado de São Paulo, a existência de 1.822 áreas contaminadas. Os postos de combustíveis destacaram-se com 1.352 registros (74% do total), seguidos das atividades industriais com 279 (15%), das atividades comerciais com 105 (6%), das instalações para destinação de resíduos com 66 (4%) e dos casos de acidentes e fonte de contaminação de origem desconhecida com 20 (1%). Os vazamentos em postos de combustíveis são causados pela falta de manutenção de equipamentos, pela deterioração de tanques e tubulações e, também, por falhas operacionais decorrentes do despreparo dos profissionais que atuam nesses estabelecimentos. Os principais grupos de contaminantes encontrados nestas áreas foram: solventes



aromáticos (BTX), combustíveis líquidos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PHAs), metais e solventes halogenados. Das áreas contaminadas, apenas 3% estão totalmente recuperadas, 37% estão sendo remediadas, 9% possuem proposta de remediação e 51% das áreas contaminadas não possui proposta de remediação (CETESB, 2006).

### **2.3 Remediação**

Uma grande variedade de processos físico-químicos e biológicos têm sido utilizados na remoção de hidrocarbonetos de petróleo puros e dissolvidos na água subterrânea. Os tratamentos físicos separam o material, sem destruí-lo ou modificá-lo quimicamente. Os tratamentos biológicos compreendem técnicas que utilizam microrganismos para degradar ou decompor compostos considerados tóxicos ou poluentes. O processo biológico vem a ser uma alternativa mais viável economicamente, assim como mais eficaz no que tange a remoção do contaminante. A biorremediação pode ser simples em termos de manutenção, aplicável em grandes áreas e com grande vantagem de conduzir a diminuição ou completa destruição do contaminante (Cunha & Leite, 2000; Malina et al., 2002). Estes processos podem ser implementados para controlar o movimento de plumas (contaminantes), tratar águas subterrâneas e/ou descontaminar solos (Corseuil et al., 1998).

A biorremediação é baseada na capacidade dos microrganismos (bactérias, fungos, algas, protozoários e metazoa) em alcançar a partícula de contaminante no solo ou água, e converter este em uma molécula inofensiva, como

o dióxido de carbono e a água ou imobilizar o contaminante em uma forma não solúvel ou mais estável (Diels, 2007).

As estratégias usadas para a biorremediação no ambiente são: biorremediação por atenuação natural; bioestimulação e bioaugmentação. Na biorremediação por atenuação natural o hidrocarboneto é degradado pelos microrganismos nativos do solo, ao passo que na bioestimulação a biota degradadora recebe aporte de nutrientes e aeração, para estimular seu crescimento. A bioaugmentação envolve a inoculação de culturas puras e/ou de consórcios microbianos, contendo microrganismos pré-selecionados, com potencial de degradação e competição, para metabolizar compostos específicos.

A atenuação natural, de uma contaminação por hidrocarbonetos, pode ocorrer através de diversos processos incluindo a biodegradação *in situ*, por microrganismos presentes naturalmente no local, diluição, dispersão, sorção e volatilização. Entre estes eventos a biodegradação é a única reação que modifica o hidrocarboneto, resultando na redução da massa do poluente (Bhupathiraju et al., 2002). Durante este processo os microrganismos naturalmente presentes no ambiente contaminado, degradam ou precipitam o poluente através do consumo natural dos doadores e aceptores de elétrons presentes. Contudo, em vários casos os aceptores de elétrons, como o oxigênio, não estão em quantidades suficientes e são rapidamente exauridos (Diels, 2007).

Rahman et al., 2002, observaram que a adição de um consócio há uma remediação *in situ*, aumentou o número de bactérias degradadoras, no entanto, não se observou diferença na quantidade de hidrocarboneto degradado. Isto pode ter

ocorrido devido a baixa concentração de hidrocarbonetos, nos ensaios testados ou porque o inóculo não se adaptou totalmente a degradação do poluente no ambiente.

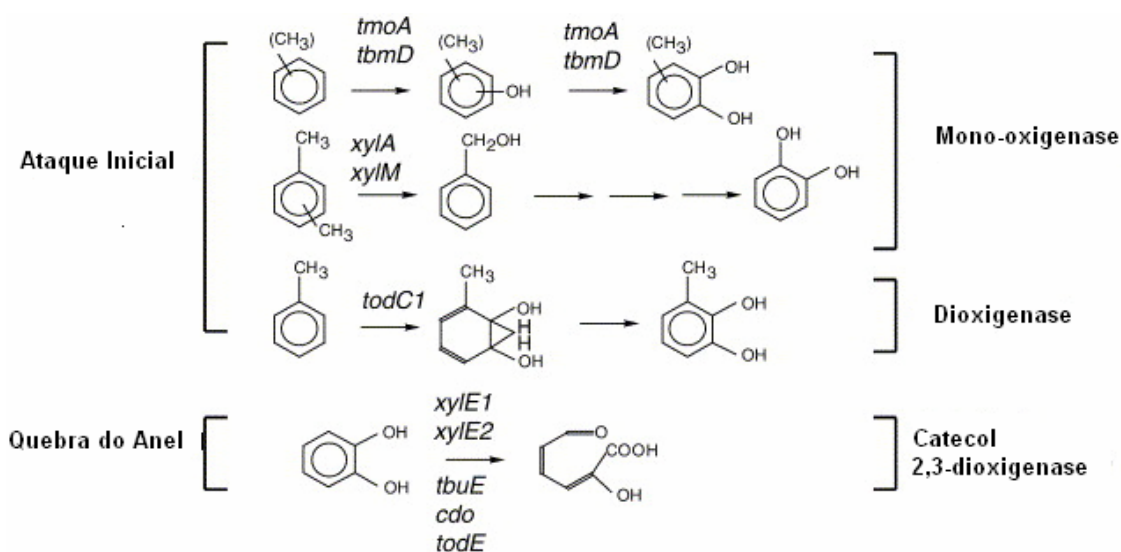
O balanceamento ou compensação de certos nutrientes importantes para o metabolismo celular como nitrogênio e fósforo, e o adequado fornecimento de oxigênio, estimulando a degradação aeróbia, são condições fundamentais para aplicação da biorremediação.

## 2.4 Degradação

Os microrganismos degradam compostos orgânicos, para recuperar a energia química, conservada no esqueleto C-C. Moléculas orgânicas complexas são, desse modo, convertidas em compostos mais simples e finalmente, em dióxido de carbono ou metano e água. Partes de alguns compostos são degradados, para obter componentes necessários a formação de novas células (Diels, 2007). O melhor resultado deste processo é a mineralização do poluente, o que implica na formação de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e biomassa .

A degradação aeróbica dos hidrocarbonetos aromáticos BTX, pode ocorrer de diversas formas. O ataque inicial envolve a oxidação direta do anel aromático por uma mono-oxigenase, que adiciona uma molécula de oxigênio ao anel aromático ou uma dioxigenase, que adiciona duas moléculas de oxigênio (Gibson & Parales, 2000), também pode ocorrer a oxidação da cadeia lateral, reação catalizada por uma mono-oxigenase. A maioria das rotas de degradação dos hidrocarbonetos aromáticos resultam em intermediários do catecol (Junca & Pieper, 2004), que são tipicamente quebrados por uma *ortho*- ou *meta*-dioxigenase. As *meta*-dioxigenases

ou catecol 2,3-dioxigenases, são relatadas com mais freqüência na literatura (Mesarch et al., 2000; Junca & Pieper, 2004; Hendrickx et al., 2006) (Figura 3). Posteriormente a estrutura resultante é degradada a um dos intermediários do Ciclo de Krebs, como o ácido acético, acetaldeído ou ácido pirúvico.



**Figura 3.** Apresentação esquemática de algumas reações enzimáticas possíveis, durante a degradação dos hidrocarbonetos BTEX (modificado de Hendrickx et al., 2006).

A maioria dos hidrocarbonetos são prontamente degradados em condições aeróbias. Em ambientes abaixo da superfície, a atividade aeróbia de microrganismos, pode reduzir os níveis de oxigênio, gerando ambientes anaeróbicos (Bhupathiraju et al., 2002). Estudos demonstram a biodegradação de hidrocarbonetos na ausência de oxigênio, utilizando outros aceptores finais de elétrons, mas em níveis substancialmente mais baixos, em relação a biodegradação em condições aeróbias (Chen e Taylor, 1997; Bhupathiraju et al., 2002; Botton e Parson, 2007; Siddique et al., 2007). Empiricamente, em condições aeróbias, é

possível obter um rendimento entre 0.05-0.6 mol biomassa/mol de carbono, no entanto em condições anaeróbias o rendimento foi de 0.04-0.083 mol (Diels, 2007).

Corseuil et al., 1998, estudaram a degradação, preferencial do etanol em relação aos compostos BTX, em microcosmos com condições aeróbias e anaeróbias e concluíram que em ambas condições, o etanol era preferencialmente utilizado, pelos microrganismos, em relação aos compostos aromáticos. O que pode impedir que a população microbiana capaz de degradar os compostos BTX, expresse completamente seu potencial catabólico, levando a um retardo na degradação destes hidrocarbonetos.

A causa mais provável para a não degradação dos BTXE em presença de etanol, deve-se a composição do etanol, que é um substrato mais facilmente degradado quando comparado ao benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno. O que pode ocasionar, em ambientes com pouca disponibilidade de aceptores finais de elétrons, uma demanda de oxigênio suficiente para tornar o meio anaeróbio (Alvarez & Hunt, 2002).

Um estudo analisando a degradação aeróbia do benzeno na ausência e presença do etanol, empregando uma cultura pura (RR1) Deeb et al., (2002) observaram que durante a degradação do etanol, o microrganismo não apresentou uma fase de latência (lag) duradoura, indicando que as enzimas envolvidas na degradação do alceno são constitutivas, no entanto durante a degradação do benzeno, por este mesmo microrganismo, foi observada uma longa fase de latência (lag), indicando a síntese de enzimas induzidas.

Outro fator importante na degradação dos BTX são as interações que podem ocorrer entre estes substratos (Alvarez & Vogel, 1991; Chang et al., 1993; Reardon et al., 2002; Otenio et al., 2005). A presença de um dos hidrocarbonetos BTX pode estimular a degradação de outro composto BTX, pela indução da expressão das enzimas necessárias para a sua metabolização, pelo microrganismo (Alvarez & Vogel, 1991). Como por exemplo o tolueno, que é considerado um bom indutor de enzimas, influenciou a degradação do benzeno por diferentes culturas de microrganismos, tanto puras como em consócio (Alvarez & Vogel, 1991; Chang et al., 1993; Gülensoy & Alvarez, 1999).

No entanto a presença de um dos hidrocarbonetos aromáticos BTX pode inibir a degradação de outro, devido a: 1) inibição competitiva por enzimas, ocorre quando o hidrocarboneto usa a mesma rota metabólica para a degradação de diferentes contaminantes presentes no meio de cultura (Reardon et al., 2002); 2) redução de aceptores finais de elétrons, como o oxigênio (Bhupathiraju et al., 2002); 3) toxicidade dos próprios hidrocarbonetos; 4) pela formação de metabólitos intermediários tóxicos, devido a ação de enzimas inespecíficas (Bartels et al., 1984). Yu et al. (2001) observaram que a adição de benzeno, tolueno e *p*-xileno, simultaneamente no mesmo ensaio, inibiu a degradação dos três substratos, devido a competitividade.

Reardon et al., 2002 estudaram as possíveis interações entre os substratos benzeno, tolueno e fenol, degradados pela cepa *Pseudomonas putida* F1, que utiliza a mesma rota metabólica para a degradação dos três poluentes. Observaram que quando o fenol era inoculado no meio de cultura, junto com o

tolueno ou o benzeno, este só era degradado após o esgotamento do benzeno e tolueno. No entanto, quando inoculado o benzeno e o tolueno juntos, estes eram degradados simultaneamente. A autora sugere que o benzeno e o tolueno, por serem substratos mais hidrofóbicos, provocam uma adaptação na membrana da cepa de *P. putida* F1, que facilita a difusão destes contaminantes, para o interior da célula. Mas, quando a degradação do tolueno e benzeno está completa, a conformação das proteínas da membrana muda, facilitando a entrada do fenol para o interior da célula.

## **2.5 Biossurfactantes**

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas que reduzem a tensão superficial e interfacial, porque se acumulam na interface de fluídos imiscíveis ou entre um sólido e um fluído, aumentando a área de contato destes compostos insolúveis, proporcionando maior mobilidade, biodisponibilidade e conseqüentemente biodegradação (Banat et al., 2000). Devido a estas propriedades, os surfactantes alteram o comportamento interfacial e alteram o comportamento de outras moléculas nas interfaces e soluções (Van Hamme et al., 2006).

Uma interface é qualquer limite entre duas diferentes fases (ex. gás-líquido, líquido-líquido, sólido-líquido, etc.) e a vida microbiana pode ser mais comum nesta área, como evidenciado pelos biofilmes, filmes de superfície e agregados. As interfaces controlam as transferências de nutrientes, sinais entre moléculas e são o sítio de interação entre hospedeiro e microrganismos Os biossurfactantes são um mecanismo

comum pelo qual os microrganismos lidam com os desafios das interfaces. (Van Hamme et al., 2006).

Muitas pesquisas têm sido feitas, no intuito, de determinar como os microrganismos interagem com compostos orgânicos hidrofóbicos. Os biossurfactantes tem sido freqüentemente citados como um mecanismo pelo qual os microrganismos aumentam seu acesso a substratos pouco solúveis sendo transportadas, tanto passivamente como ativamente, o composto apolar para o interior da célula (Van Hamme et al., 2006).

Muitos dos contaminantes mais persistentes no ambiente, exibem baixa solubilidade em água, a biodisponibilidade destes pode muitas vezes ser estimulada pela adição de emulsificantes. Reduzindo a tensão superficial e interfacial entre os líquidos, sólidos e gases, permitindo que os contaminantes se dispersem rapidamente, como emulsões (Banat et al. 2000). Os microrganismos já desenvolveram várias formas naturais para degradar compostos orgânicos, em geral relacionados a sua capacidade de gerar superfícies hidrofóbicas nas células ou secretar surfactantes no meio, ao redor das células (Singh et al., 2007).

### **2.5.1 Métodos de detecção**

Segundo a literatura existem várias metodologias de detecção de biossurfactantes, entre as mais simples estão relacionadas: atividade hemolítica do surfactante; técnica do espalhamento do óleo e técnica de colapso da gota.

Youssef et al. (2004) relataram que apenas 13,5% das cepas que apresentaram hemólise reduziram a tensão superficial a valores menores que 40



mN/m e 38,2% das cepas que não provocaram hemólise apresentaram resultados positivos em outras técnicas de detecção. Diferentes compostos, como fatores de virulência, podem causar hemólise e biossurfactantes com baixa capacidade de difusão podem não lisar as células.

Tanto a técnica do espalhamento do óleo como o colapso da gota, podem gerar dados qualitativos ou quantitativos. Plaza et al., (2006) obtiveram bons resultados utilizando a técnica de espalhamento do óleo, considerando o método fácil e rápido, já a técnica de colapso da gota mostrou resultados mais variáveis. No entanto, segundo o autor, estas metodologias não são precisas, havendo grandes variações nos valores de redução da tensão superficial dos isolados que apresentaram resultados positivos, oscilando entre 35 e 67 mN/m.

Por estas razões os autores sugerem que estes métodos, sejam confirmados utilizando técnicas baseadas em medidas da capacidade de redução da tensão.

Um surfactante por definição é uma molécula anfipática, isto é apresentam uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. A redução da tensão superficial ocorre devido à característica anfipática da molécula, capaz de reduzir a energia livre do sistema pela transferência de moléculas de alta energia do interior de uma solução para a interface (Maier, 2003; Mulligan, 2005). As moléculas de qualquer líquido localizadas na interface líquido/gás realizam um menor número de interações intermoleculares, comparadas com as moléculas que se encontram no interior do líquido. A tensão superficial é a força que atua na superfície dos líquidos (Bodour & Maier, 2002)

A tensão superficial, pode ser quantificada, através da medida da força exigida para mover um anel de platina (Du Nouy) ou a placa de Wilhelmy (lamínula) que está sobre um líquido através do ar. Este método é amplamente utilizado devido a sua reprodutibilidade (Maier, 2002; Bodour & Maier, 2002; Youssef *et al.*, 2004; Cunha *et al.*, 2004). No entanto, algumas substâncias do meio de cultura, como a peptona ou solventes como o metanol ou etanol, podem reduzir a tensão superficial na ausência de um surfactante (Miller & Zhang, 1997).

Uma emulsão é uma mistura estável de dois líquidos. Normalmente, uma mistura de óleo e água forma fases separadas, entretanto se a mistura é agitada vigorosamente, o óleo vai dispersar na fase aquosa. Se a agitação cessar, as fases se separam rapidamente. Quando se adiciona um surfactante se obtém uma mistura estável ou uma emulsão. Para a formação de gotas de óleo na água, é preciso que o emulsificante seja solúvel em água e a porção hidrofóbica do bioemulsificante será adsorvida na fase oleosa dispersa e a porção hidrofílica ficará na interfase. A estabilidade da emulsão é garantida pela formação de filmes na superfície das gotículas de óleo na fase aquosa, que tendem a se manter por longos períodos, refletindo a efetividade do emulsificante (Maier, 2003).

Os biossurfactantes poliméricos com capacidade de emulsificar o meio, são produzidos por várias bactérias, archae e leveduras. Em geral estes biossurfactantes não reduzem a tensão superficial do meio significativamente (Bodour & Maier, 2002). Um dos biossurfactantes poliméricos melhor caracterizado é o emulsan, produzido pelo *Acinetobacter calcoaceticus* RAG I (Van der Mei *et al.*, 1991). Este microrganismo produz uma proteína associada ao polímero que provoca

a emulsificação, no entanto a capacidade de redução da tensão superficial é baixa, 52 mN/m, segundo Bodour & Maier, (2002). Todavia alguns autores observaram relação direta entre emulsificação e redução da tensão (Cunha et al., 2004; Mata-Sandoval et al., 1999).

### **2.5.1.1 Concentração Micelar Crítica (CMC)**

As moléculas de surfactantes são constituídas por monômeros contendo uma porção hidrofílica formado por um dos grupos: éster, fosfato, hidroxil, caboxil, ou um carboidrato, este normalmente é neutro ou carregado negativamente. A porção hidrofóbica é constituída por um ácido graxo, contendo de 8 a 18 carbonos (Maier, 2003).

Os monômeros de surfactante em solução, irão reduzir a tensão do meio até atingir a concentração micelar crítica (CMC). Após esta concentração nenhuma redução na tensão superficial ou interfacial será observada. Na CMC os monômeros de surfactantes começam a se associar espontaneamente em estruturas como micelas, vesículas e lamelas. A CMC para qualquer biossurfactante vai depender da estrutura do surfactante, do pH, força iônica e temperatura da solução (Maier, 2003). A CMC pode ser determinada pela medida da tensão superficial em uma série de amostras diluídas, de um surfactante, em um tampão fosfato (0,1 M pH:7,0) (Miller & Zhang, 1997).

A concentração de surfactante necessária para atingir a tensão superficial mais baixa possível, é definida como a concentração micelar crítica. A CMC de um biossurfactante normalmente varia entre 1 a 200 mg/L (Zhang & Miller, 1992).

Altas concentrações de biossurfactantes ( $>CMC$ ) podem aumentar a solubilidade de substâncias hidrofóbicas, incorporando-as nas micelas ou diminuindo a sorção do contaminante no solo. Baixas concentrações de biossurfactantes ( $<CMC$ ) induzem alterações na superfície celular, permitindo melhor contato entre contaminante e microrganismo, este acesso pode provocar maior degradação do contaminante (Bodour & Maier, 2002).

### **2.5.2 Influência na degradação de hidrocarbonetos**

Os biossurfactantes influenciam o comportamento fisiológico dos microrganismos nas áreas como mobilidade celular, comunicação entre células, acesso a nutrientes, competição célula-célula e patogenicidade em plantas e animais (Van Hamme et al., 2006).

Surfactantes de origem biológica quando adicionados em um microcosmo contendo água de rio, rapidamente adsorvem-se na superfície dos sedimentos, onde são encontrados contaminantes orgânicos hidrofóbicos, estimulando os microrganismos presentes a se fixar às partículas do sedimento. Este processo torna espacialmente possível o contato entre poluente e microrganismo, maximizando a biodegradação. Os surfactantes de origem química não apresenta o mesmo efeito (Owen et al., 1997).

Em ambientes como o solo, onde ocorrem muitas interações químicas, entre os hidrocarbonetos e a matéria orgânica, a biodisponibilidade é dificultada pelo efeito da sorção. No solo, os biossurfactantes aumentam a solubilidade e liberam os contaminantes adsorvidos nos minerais e na matéria orgânica. O aumento da

biodisponibilidade dos compostos aos microrganismos, pode resultar em maior biodegradação (Ochoa-Loza et al., 2007). Esta técnica pode ser utilizada, tanto, em biorremediações *in situ*, como em processos de lavagem de solo, onde, a água da lavagem recuperada, passa por um processo subsequente de degradação (Singh et al., 2007).

Rahman et al. (2007) durante estudo do aumento da degradação de hidrocarbonetos do petróleo, estimulada pelo biossurfactante ramnolipídico em microcosmos contendo meio líquido e solo, observaram que a adição do surfactante aumentou a degradação dos hidrocarbonetos e que o tratamento com adição de nutrientes e surfactante obteve melhores resultados. Segundo os autores uma das principais razões para persistência de alguns poluentes hidrofóbicos no ambiente se deve a sua forte adesão às partículas do solo, nas microporosidades. Portanto, a quantidade de contaminante biodegradado não depende apenas da sua estrutura química, mas também das condições ambientais a qual ele esta inserido. A adição do ramnolipídeo pode ter aumentado a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos aos microrganismos, que receberam o devido aporte de nutrientes.

De acordo com Singh et al., 2007, segundo a literatura, durante as interações substrato-surfactante, como a emulsificação, pseudo-solubilização e partição de hidrocarbonetos em fases, onde é esperado um aumento no acesso do microrganismo ao contaminante, tanto o estímulo da biodegradação, como a inibição da mesma, já foram observados. Uma possível causa da baixa taxa de degradação, durante um processo de biorremediação, utilizando surfactantes, é devido ao aumento

da toxicidade do contaminante hidrofóbico, provocado pela solubilização do mesmo, estimulada pelo surfactante.

Quando as células microbianas possuem superfície celular muito hidrofóbica elas normalmente acessam os contaminantes hidrofóbicos, através da adesão direta as partículas insolúveis do contaminante (Moran et al. 2000). O uso de surfactantes que pseudosolubilizem o contaminante alvo, podem inibir a adesão microbiana e conseqüentemente a biodegradação. Desta forma, de acordo com as condições ambientais encontradas em diferentes tipos de solos e aquíferos, diversidade microbiana, multiplicidade de contaminantes e variabilidade de surfactantes, bem como, as possibilidades de aplicação bem sucedida ou não, já foram relatadas, é quase impossível prever a ação de biosurfactantes específicos em processos de biorremediação, portanto testes experimentais sempre são recomendados.

### **2.5.3 Ramnolipídeos**

Ao contrário dos surfactantes sintéticos, que são classificados de acordo com a natureza da sua porção polar, os biosurfactantes são agrupados principalmente pela sua composição química e sua origem microbiana (Desai e Banat, 1997). Possuem um grupo diverso de componentes químicos, que são produzidos por uma grande variedade de microrganismos. Existem vários tipos de biosurfactantes como os lipopeptídeos sintetizados principalmente por *Bacillus sp* (Queiroga et al., 2003), os glicolipídeos sintetizados por espécies de *Pseudomonas sp* (Schenk et al., 1995), *Rhodococcus sp* (Niescher et al., 2005) e *Cândida sp*, os

fosfolipídeos sintetizados por *Thiobacillus thiooxidans* e os complexos polissacarídeos-lipídicos sintetizados por espécies de *Acinetobacter sp* (Desai & Banat, 1997).

O grupo de biossurfactantes mais conhecido são os glicolipídeos. Eles são carboidratos em combinação com longas cadeias de ácidos alifáticos ou ácidos hidroxialifáticos. Entre os glicolipídeos os mais estudados são os ramnolipídeos (Desai & Banat, 1997). Os ramnolipídeos foram identificados principalmente em espécies de *P. aeruginosa* (Zhang e Miller, 1995; Mata-Sandoval et al., 1999), mas já foram também encontrados em *P. putida* (Tuleva et al., 2002).

Koch et al. (1991) provocaram uma mutação na cepa *P. aeruginosa* PG201, tornando-a deficiente na produção de ramnolipídeos e conseqüentemente, na assimilação de hexadecano. Após, observaram que a adição de ramnolipídeo purificado na concentração de 0,01 % viabilizava o crescimento rápido de alguns mutantes, que na ausência do surfactante só apresentaram crescimento após 45 horas de incubação.

Rahman et al (2002) estudaram a produção de ramnolipídeos por duas cepas de *P. aeruginosas* DS10-129 e GS9-119, utilizando como fonte de carbono glicerol, óleo de soja e açafrão. As duas cepas foram capazes de emulsificar uma variedade de hidrocarbonetos, entre eles, gasolina, xileno e benzeno. A cepa DS10-129, apresentou capacidade de emulsificação superior a 70 %, para todos os compostos testados.

Alguns biossurfactantes não são constitutivos, necessitando a presença de substratos hidrofóbicos para sua indução, como ácidos graxos ou óleos triglicerídeos

(Ratledge, 1988). No entanto os ramnolipídeos podem ser produzidos em substratos solúveis em água como glicose ou glicerol, particularmente quando o crescimento se torna limitado em nitrogênio, indicando que estes, podem ter outros papéis além do envolvimento na solubilização de substratos hidrofóbicos (Koch et al., 1991).

Al-tahhan et al. (2000) estudaram a interação entre ramnolipídeo, células microbianas e substratos hidrofóbicos. Os resultados mostraram que o biosurfactante aumentou a interação entre célula e hidrocarboneto, devido a perda da camada lipopolissacarídica (LPS), principal constituinte da parede celular de bactérias Gram negativas. Quanto maior a concentração do surfactante, maior a perda de LPS, todavia em baixas concentrações (<CMC) foram observados danos significativos. A modificação na parede provocada pelo ramnolipídeo é provavelmente a responsável pelo aumento da hidrofobicidade celular.

Em vários estudos foi constatado que a composição do meio de cultura é determinante na natureza do ramnolipídeo produzido. Segundo Haba et al. (2000), existem diferenças estruturais nos lipídeos que compõe a ramnose, o tipo produzido depende da cepa de *Pseudomonas sp*, da fonte de carbono utilizada e a das estratégias de produção. Normalmente os ramnolipídeos são compostos por uma mistura de mono- e di-ramnolipídeos, no entanto, a variabilidade desta mistura confere diferenças físico-químicas particulares a cada biosurfactante produzido (Benicasa et al., 2004). Mata-Sandoval et al. (1999) observaram através de análises de cromatografia líquida, diferenças entre ramnolipídeos extraídos de culturas novas e antigas. Nas culturas antigas da *P. aeruginosa* UG2, uma redução das espécies  $Rh_2C_{10}C_{10}-H_2$  e  $RhC_{10}C_{10}$  foi observada, no entanto as concentrações de  $Rh_2C_{10}C_{12}$  e



Rh<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>12</sub>-H<sub>2</sub> foram mantidas. Os autores concluíram que quando as fontes de carbono foram completamente exauridas, os microrganismos podem ter tido preferência pela degradação das espécies Rh<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub>-H<sub>2</sub> e RhC<sub>10</sub>C<sub>10</sub>, contribuindo para um eventual enriquecimento das espécies Rh<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>12</sub> e Rh<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>12</sub>-H<sub>2</sub> nos extratos.

Os ramnolipídeos estão entre os mais efetivos biossurfactantes utilizados na remoção de compostos hidrofóbicos de áreas contaminadas. Eles possuem em média, ótima capacidade de redução da tensão superficial (25-30 mN/m), alta capacidade de emulsificação (50-80%) (Guerra-Santos,1984), baixa concentração micelar crítica (5-65 mg/l) e alta afinidade por moléculas orgânicas hidrofóbicas. Outra vantagem destes biossurfactantes é que eles são facilmente isolados, porque são produzidos e posteriormente excretados das células (extracelulares). Quanto a fonte de carbono utilizada na sua produção, podem ser tanto hidrofóbicas, como o petróleo, a gasolina ou o óleo de soja, ou hidrofílicas como, a glicose ou o glicerol (Holmberg, 2001) também podem ser sintetizados, a partir de efluentes de indústrias (Nitschke et al., 2005).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Isolamento de microrganismos degradadores de gasolina**

##### **3.1.1 Coleta**

Foram coletadas amostras de dois locais contaminados com hidrocarbonetos. Uma área de disposição de resíduo petroquímico (*landfarming*) do Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes (SITEL) do Pólo Petroquímico do Sul em Triunfo, RS. Esta área apresenta um histórico de 16 anos de disposição de resíduos sólidos do Pólo Petroquímico do Sul e da Refinaria Alberto Pasqualini (REFAP) em Canoas, RS, ambos com elevada carga de derivados de petróleo. Este *landfarming* é dividido em 12 células, que são áreas de 30 m x 100 m, onde os resíduos são depositados. Foram selecionadas duas células e em cada uma foram escolhidos aleatoriamente cinco pontos, onde foram realizadas as coletas de solo a uma profundidade de 30 cm.

A segunda coleta, foi realizada, em um posto de abastecimento de combustíveis, em Porto Alegre, que estava sendo remediado, através do sistema de Extração Multifásica. Esta técnica está baseada no princípio da extração a vácuo, promovendo, um forte fluxo de ar, que provoca o arraste de líquidos de diferentes fontes. A coleta foi realizada, na caixa separadora água/gasolina, um dos equipamentos encontrados neste sistema, onde foi coletada a biomassa da interface

óleo/água, totalizando um volume final de 200 ml. Esta amostra foi, gentilmente concedida, pela empresa GEOKLOCK Consultoria e Engenharia Ambiental Ltda, de Porto Alegre.

Os materiais das duas coletas realizadas foram trazidos para o Laboratório de Biorremediação de Solos, no Departamento de Solos da UFRGS, em caixas de isopor, com gelo, que após a chegada foram armazenadas sob refrigeração a 4°C.

### **3.1.2 Combustíveis e hidrocarbonetos aromáticos**

A composição química das gasolinas, foi preservada durante todo o período de execução dos testes, sendo confirmadas por análises cromatográficas regulares. Foram utilizadas gasolina comercial (24% de etanol) e gasolina pura, doados gentilmente pela distribuidora de combustíveis, Companhia Petroquímica do Sul - COPESUL. A esterilização dos combustíveis foi realizada por filtração, utilizando membranas com porosidade de 0,22 µm, sendo armazenados em frascos esterilizados, fechados hermeticamente com tampa de borracha (forrada com fita teflon) e lacre de alumínio, com o objetivo de evitar ao máximo a perda de alguns compostos por volatilização. Para evitar a foto-oxidação, os frascos foram re-cobertos por papel alumínio e acondicionados à temperatura de 4°C.

Para as análises de degradação dos compostos aromáticos BTX, foram utilizados benzeno 99,96% (P.A. Merck, Germany) tolueno 99,68% (P.A. Merck, Germany) e xilenos 99,23% (P.A. Merck, Germany).

### 3.1.3 Frascos

Para evitar a perda da fração volátil de interesse, como o etanol, benzeno, tolueno e isômeros do xileno, presentes na gasolina, todos os ensaios, envolvendo crescimento de microrganismos, utilizando este combustível como fonte de carbono, foram conduzidos em frascos de vidro (do tipo penicilina) e frascos apropriados para as análises cromatográficas, lacrados com tampa de borracha (fornada com fita teflon) e anel de alumínio ou septos para cromatografia. Nos frascos de 50 mL, do tipo penicilina, 25% do volume foi ocupado com meio mineral e os outros 75% foi ocupado com ar atmosférico, a fim de possibilitar condições aeróbias de crescimento microbiano, nos frascos para análises cromatográficas por *headspace*, foi seguida a mesma proporção.

### 3.1.4 Isolamento de microrganismos degradadores de gasolina comercial

Nos frascos, foram adicionados 1 g de solo do *landfarming* ou 1 ml da borra, coletada na caixa separadora água/gasolina, 13 ml de meio mineral (Apêndice 8.1.1), com pH ajustado para 7,2 e 1% (v/v) de gasolina comercial. Os frascos foram incubados a 30 °C, sob agitação constante (150 rpm). Durante 15 dias, a cada 5 dias de crescimento, uma alíquota de 1 mL da cultura foi transferida para outro frasco, contendo o mesmo meio estéril e gasolina comercial.

A terceira transferência foi realizado um procedimento de diluições sucessivas, visando obter colônias isoladas das bactérias. A cultura foi diluída em solução salina (NaCl 0,85%) e plaqueada em meio agar nutritivo (Apêndice 8.1.2), sendo as placas de Petri incubadas a 30 °C por 24 horas. As colônias de bactérias crescidas nas placas, que apresentaram diferenças morfológicas visuais tais como: aspecto, tamanho, coloração, forma e borda da colônia, foram estriadas no mesmo meio até purificação das colônias, posteriormente, armazenadas sob refrigeração a 4 °C, em tubos de ensaio contendo o mesmo meio inclinado, com transferências para meios de cultura novos a cada 15 dias.

### **3.2 Preparo do pré-inóculo**

No preparo do pré-inóculo os isolados selecionados, foram transferidos, com o auxílio de uma alça de platina, da cultura estoque para um frasco erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de caldo nutritivo (Apêndice 8.1.3), este era incubado sob agitação de 150 rpm, a 30°C, durante 18 horas. Após este período, as células foram centrifugadas a 8.000 rpm, por 20 minutos e lavadas com solução salina (NaCl 0,85%) estéril. Este procedimento foi repetido três vezes. Ao fim do processo, o *pellet* era ressuspendido em meio mineral, e uma alíquota da cultura foi retirada e inoculada, nos frasco hermeticamente fechado.

Em todos os experimentos de degradação foi utilizado um inóculo inicial padrão de  $10^5$  UFC, que tem uma absorbância de 0,07, em 600 nm (Spectrumlab, 22PC, Brasil). Estes valores apresentam pequenas variações de acordo com cada cepa.

Este procedimento foi realizado, em todos os ensaios, onde a gasolina comercial ou gasolina pura ou fração BTX foram utilizados como única ou uma das fontes de carbono.

### **3.3 Avaliação da capacidade de degradação preliminar da gasolina e derivados**

A medida da atividade de uma ou mais enzimas da cadeia respiratória, pode ser utilizada como índice da atividade oxidativa total da célula. Um dos métodos, mais utilizados para estimar a atividade da enzima desidrogenase no solo, é baseado no uso do indicador redox cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), como um acceptor final de elétrons, que é reduzido para trifenil formazan (TPF) (Alef, 1995; Bento et al, 2005).

#### **3.3.1 Gasolina comercial e gasolina pura**

Nos frascos hermeticamente fechados foram adicionados: meio mineral com TTC (Apêndice 8.1.4), 1% de gasolina comercial ou gasolina pura e o inóculo do isolado a ser avaliado. Os frascos foram incubados em duplicatas a 30°C, sob agitação constante (150 rpm), por 72 horas. Os tratamentos controles consistiam de frascos não inoculados, contendo meio mineral, TTC e 1% de gasolina comercial. Para evitar a fotoxidação, todos os frascos foram re-cobertos por papel alumínio. A redução do TTC a TPF foi avaliada visualmente pela mudança na coloração do meio de incolor, para a cor lilás e roxo.

### 3.3.2 Fração BTX

Foram conduzidos experimentos da capacidade de crescimento dos isolados na fração benzeno, tolueno e xilenos (BTX) (P.A), foram utilizados frascos do tipo penicilina, hermeticamente fechados, contendo meio mineral, indicador redox TTC e BTX. Quando testados individualmente, foram adicionados  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de cada hidrocarboneto ( $3,8 \text{ }\mu\text{l}$  de benzeno,  $3,25 \text{ }\mu\text{l}$  de tolueno e  $2,8 \text{ }\mu\text{l}$  dos isômeros de xileno). A degradação dos isômeros do xileno (*orto*, *meta* e *para*-xilenos) foi analisada separadamente, segundo os dados obtidos na cromatografia gasosa, no entanto, estes foram inoculados sempre juntos, porque estavam armazenados em uma solução única. Nos ensaios onde foram inoculados os três compostos aromáticos juntos, foram adicionados  $30 \text{ mg L}^{-1}$  de cada hidrocarboneto ( $2,3 \text{ }\mu\text{l}$  de benzeno,  $1,95 \text{ }\mu\text{l}$  de tolueno e  $1,7 \text{ }\mu\text{l}$  dos isômeros de xileno), totalizando  $90 \text{ mg L}^{-1}$ . As quantidades de hidrocarbonetos aromáticos inoculadas em cada frasco, foram definidas de acordo com a literatura (Alvarez & Vogel, 1991; Otenio et al., 2005; Deeb et al., 2002).

### 3.4 Avaliação da capacidade de produção de biossurfactantes

A detecção da produção de biossurfactantes foi realizada pela medida do índice de emulsificação, tensão superficial do meio de cultura e teste colorimétrico. Na medida da tensão superficial e emulsificação, foi utilizada a cultura do teste anterior (análise prévia de degradação da gasolina comercial), onde a única fonte de carbono disponível era a gasolina comercial.

### **3.4.1 Tensão superficial**

A medida da tensão superficial foi avaliada na ausência de células microbianas, removidas através de centrifugação, a 10.000 rpm por 15 minutos. As amostras permaneceram por 30 minutos a temperatura ambiente e a tensão superficial foi determinada em um medidor de tensão superficial digital (Gibertini, Milão, Itália), utilizando o método da placa de Wilhelmy. Como padrões utilizou-se a água destilada ( $72 \text{ mN m}^{-1}$ ) e etanol ( $24 \text{ mN m}^{-1}$ ).

### **3.4.2 Índice de emulsificação**

A avaliação do índice de emulsificação (Cooper & Goldenberger, 1987) foi realizada na presença das células microbianas e com o sobrenadante, porque o biossurfactante pode ser excretado no meio ou permanecer fixo ao envoltório celular do microrganismo. Neste teste, 2 mL do meio de cultura, foram misturados a 2 mL de gasolina em tubos de ensaio com fundo chato (100 mm x 15 mm), sendo a mistura agitada em vortex por 2 minutos e os frascos deixados em repouso por 24 horas. Após este período, foi avaliada a presença de emulsão. O índice de emulsificação é obtido pela medida da coluna emulsificada, dividido pela altura total e multiplicado por 100.

Para este ensaio foi definido um código de acordo com o tamanho da emulsificação que o isolado foi capaz de realizar, para facilitar a comparação entre os isolados. Foram definidos, neste trabalho, três níveis de emulsificação: (\*) emulsificação entre 5 e 20%, (\*\*) emulsificação entre 21 e 40% e (\*\*\*) emulsificação entre 41 e 60%.



### 3.4.3 Teste colorimétrico

Esta técnica foi originalmente desenvolvida para selecionar ramnolípidios, biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa*, mas pode ser utilizada para selecionar qualquer biossurfactante aniônico de baixo peso molecular (Bodour & Maier, 2002). Estes biossurfactantes formam um par iônico insolúvel com o surfactante catiônico brometo de cetilmetilamônio e o corante básico azul de metileno, que são adicionados no meio mineral com ágar em placas de petri (Siegmond & Vagner, 1991).

Os isolados foram inoculados no meio sólido (Apêndice 8.1.5), com o auxílio de uma agulha de platina, em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 30°C, durante 96 horas. A formação de halo azul escuro ao redor das colônias, indica resultado positivo, para a produção de biossurfactantes do tipo ramnolipídeo.

### 3.5 Análise da cinética de crescimento e produção de biossurfactantes

As cepas capazes de crescer em meio mineral com 1% de gasolina comercial, formar emulsificação significativa e reduzir a medida de tensão do meio de cultura, para valores inferiores a 40 mN m, foram selecionados, para análises posteriores.

O pré-inóculo foi preparado de acordo com o item 3.2. As culturas foram inoculadas em frascos de penicilina contendo meio mineral (12,8 ml) e 1% de gasolina, em seguida foram hermeticamente fechados e incubados sob agitação orbital (150 rpm) a 30°C. Devido a característica dos compostos analisados, alto

valor de pressão de vapor (alta capacidade de volatilização) foi utilizado um frasco, para cada ponto da curva de crescimento, que após as análises foram descartados. O crescimento de cada isolado, foi avaliado individualmente, durante 72 horas, em intervalos de 8 em 8 horas. Durante este ensaio foram realizadas medidas da capacidade de emulsificação, redução da tensão superficial do meio e crescimento microbiano, determinado em espectrofotômetro (Spectrumlab, 22PC, Brasil), em 600 nm.

Para avaliar a capacidade de degradação de etanol e BTX, presentes na gasolina comercial, foram realizadas análises cromatográficas no tempo 0 horas e 72 horas, deste experimento.

### **3.6 Interações entre microrganismos**

Neste experimento foram utilizados microrganismos, com dois perfis diferentes, segundo os testes realizados: isolados, que não apresentaram resultados satisfatórios para produção de biossurfactantes, mas capazes de crescer em todas as fontes de carbono testadas (gasolina com e sem adição de álcool, benzeno, tolueno, xileno a na mistura destes hidrocarbonetos (BTX)) e um isolado incapaz de crescer em gasolina pura e BTX (P.A) nas condições avaliadas, no entanto, promissor produtor de biossurfactante.

O inóculo foi obtido de acordo com o item 3.2. Para isto utilizaram-se frascos de penicilina, contendo meio mineral (Apêndice 8.1.1) e 1% de gasolina comercial, que foram posteriormente hermeticamente fechados e incubados sob agitação orbital (150 rpm) a 30 °C. Foram realizados teste de produção de

biossurfactantes, de acordo com o itens 3.4.1 e 3.4.2 e crescimento microbiano determinado em espectrofotômetro, na absorvância de 600 nm. Estas análises foram feitas no tempo 0 e 72 horas, e posteriormente, comparadas com os resultados do crescimento dos isolados individualmente, sob as mesmas condições.

### **3.6.1 Identificação dos isolados**

#### **3.6.1.1 Extração do DNA**

Os isolados bacterianos foram identificados pelo sequenciamento da região 16S do gene do rRNA, como descrito por Camargo *et al.* (2003) e Jacques (2005). As células foram crescidas em meio caldo nutriente, durante 12 horas, posteriormente centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. O DNA total foi extraído de acordo com o método descrito por Asubel *et al.* (1997). O precipitado foi suspenso em tampão TE (Apêndice 8.2), SDS (10%) (Apêndice 8.2) e proteinase K, e incubadas por 1 hora a 37°C. Soluções de NaCl (5 M) e CTAB/NaCl (Apêndice 8.2) foram adicionados, incubando-se por 10 min a 65°C. A solução foi extraída com 780 µl de fenol/clorofórmio/álcool isoamilico (24:1), centrifugado por 5 minutos, sendo a fase aquosa novamente extraída com igual volume de clorofórmio/álcool isoamilico (25:24:1). Após centrifugação por 5 min, o DNA presente na fase aquosa foi precipitado com 0,6 na proporção de volume de isopropanol e o precipitado lavado com etanol 70%. O precipitado de DNA foi seco usando concentrador e ressuspenso em água livre de nucleases.

### 3.6.1.2 Sequenciamento da região 16S

A amplificação da região 16S do gene do rRNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) foi conduzida utilizando “ependorf mastercycler”. Nucleotídeos iniciadores universais correspondendo as posições 27f (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') e 1492r (5'-TACGGTACCTTGTTACGACTT-3') de *E. coli* foram utilizados para a amplificação do gene. A mistura para PCR consistia em 25 µl de “master mix” (Promega, Madison, WI), DNA genômico (2 ml), 27f (25 pmol), 1492r (25 pmol) e 50 µl de água livre de nuclease. O gene 16S rRNA foi amplificado utilizando 35 ciclos de PCR (desnaturação inicial, 95°C for 5 min; desnaturação subsequente, 95°C por 5 min; temperatura de anelamento, 50°C por 1 min; temperatura de extensão, 72°C por 1 min e extensão final, 72°C por 5 min). Os produtos do PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. Unidades filtrantes de “Millipore Montage-PCR” (Millipore Corp, Billerica, MA) foram utilizadas para remover impurezas. O sequenciamento do DNA foi realizado utilizando o kit terminador “BigDye” (Applied Biosystems, Foster City, CA) com os nucleotídeos iniciadores 519r (5'-GATTACCGCGGCGCTG-3'). A homologia das seqüências bacterianas foi obtida através do programa MEGABLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/megablast.shtml](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/megablast.shtml)).

### 3.7 Análise da degradação dos hidrocarbonetos

Os experimentos envolvendo análises cromatográficas foram realizados em frascos hermeticamente fechados, com selos de alumínio de 20 mm. Em todos os experimentos foram realizados dois controles, um no início (0 horas) e outro no

final (72 horas), incubados sob agitação a 30 °C. A análise estatística foi realizada com todos os resultados de degradação, em relação aos controles. Os resultados foram obtidos através do cálculo da diferença de área entre o controle 72 horas sem inóculo e a cultura, após 72 horas de incubação.

### 3.7.1 Cromatografia gasosa

A capacidade dos isolados em degradar etanol e BTX foi avaliada através de cromatografia gasosa, utilizando a técnica de amostragem por *headspace*. Para isso, os isolados foram inoculados, de acordo com o item 3.3, em frascos para amostragem por *headspace*, contendo 6 mL de meio mineral (Apêndice 8.1.1) e o contaminante alvo gasolina comercial ou gasolina pura ou BTX, seguido de incubação sob agitação orbital (150 rpm), a 30 °C por 72 horas.

O material foi analisado em um cromatógrafo gasoso (Shimadzu 17A, Japão), equipado com detector de ionização de chama e sistema de injeção *headspace* (HS/GC/FID), coluna DB5 (poli-metil-siloxano com 5% de grupos fenila) de 30 metros de comprimento por 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de fase estacionária e gás de arraste H<sub>2</sub> com fluxo de 1,5 mL min<sup>-1</sup>. As condições cromatográficas de análise foram realizadas segundo o método EPA 8015-B-96, a seguir descrito: temperatura e tempo de condicionamento do frasco de 80 °C por 15 minutos; programa de temperatura do forno de 40 °C por 3 minutos, seguido de taxa de aquecimento de 5 °C min<sup>-1</sup> até 90 °C, mantido por 5 minutos nesta temperatura com posterior aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup> até 150°C onde permaneceu por um minuto. As temperaturas do injetor e detector foram 120 °C e

210 °C, respectivamente. Foi injetado 1,0 µL em modo de injeção *splitless* (um dos modos de injeção de cromatografia gasosa sem divisão). Nestas condições o tempo de análise foi de 43 minutos.

Os resultados foram apresentados na forma de percentual de degradação de cada pico (etanol, benzeno, tolueno, isômeros do xileno), pela comparação da área dos picos apresentados após incubação e pelo controle. Foram conduzidos ensaios controles, que consistiam de meio mineral a as frações de hidrocarbonetos estudadas, sem a inoculação dos microrganismos, permitindo diferenciar perdas por volatilização, da degradação bacteriana.

### **3.7.2 Faixa de linearidade**

Para as análises cromatográficas foram realizados ensaios para determinar a faixa de linearidade. Para tal, foram analisadas soluções de meio mineral com os analitos benzeno, tolueno e isômeros do xileno na faixa de concentração de 12,5, 25 e 50 mg/L, segundo o método descrito anteriormente (Apêndice 8.3).

## **3.8 Produção de biossurfactantes**

### **3.8.1 Teste com diferentes meios para produção de ramnolipídeos**

Para a produção de biossurfactantes, os microrganismos podem utilizar desde substâncias hidrófilas como a glicose até substratos hidrófobos como os hidrocarbonetos. Foram avaliados 4 diferentes meios (Apêndices 8.1.6, 8.1.7 e 8.1.8), na tentativa de otimizar, a produção dos biossurfactantes.

Durante a avaliação prévia dos meios, os isolados UFRGS38, UFRGS95, UFRS97, UFRGS98, UFRGS103 e UFRGS123 foram inoculados, com o auxílio de uma alça de platina, nos meios testados, que em seguida, foram incubados sob agitação orbital (150 rpm) a 30 °C, durante 5 dias. No final deste período foram medidas a tensão superficial do meio e a capacidade de emulsificação do óleo diesel, com exceção do meio de cultura onde foi utilizado como fonte de carbono o óleo de soja, onde o teste foi feito com óleo de soja.

Com os dois melhores meios, PPGAS (Apêndice 8.1.7) e ácido fosfórico + 2% glicose + meio mineral (MSM + 2% Glicose) (Apêndice 8.1.6), para produção de biossurfactantes, foram realizadas curvas de crescimentos durante 7 dias, onde foram retiradas alíquotas a cada dia, para análises da capacidade de emulsificação, redução da tensão superficial do meio e crescimento microbiano, determinado em espectrofotômetro (Spectrumlab, 22PC, Brasil), em 600 nm.

### **3.8.2 Extração do ramnolipídeo**

A extração do ramnolipídeo foi realizada de acordo com Zhang e Miller, (1992), após 5 dias de incubação, nos meios: Proteose, Fosfato-limitado, Peptona, Glicose (0,05%) e sais de Amônia (PPGAS) (Apêndice 8.1.7) e MSM + 2% Glicose (Apêndice 8.1.6). As células foram removidas por centrifugação, a 8.000 rpm, por 20 minutos, após o biossurfactante foi precipitado através da acidificação do sobrenadante, com 1M HCl, até pH 2.0, em seguida centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos. O precipitado foi diluído em 0,05M bicarbonato (pH 8.6), reacidificado e centrifugado, mais uma vez. Após o biossurfactante foi precipitado e extraído, três

vezes, com clorofórmio-etanol (2:1). O solvente orgânico foi evaporado, em evaporador rotatório e o resíduo foi diluído em bicarbonato.

### **3.8.3 Quantificação do ramnolipídeo**

Os carboidratos totais foram dosados pelo método de Dubois et al, (1956). Em tubos de ensaio foram adicionados 2 ml de ácido sulfúrico concentrado, 320  $\mu$ l da solução de fenol 5% (p/v) e 80  $\mu$ l da amostras (biossurfactante extraído). Os tubos foram agitados e incubados a 100 °C, por 5 minutos. Após, foi realizada leitura da absorbância, em 490 nm, frente ao branco, contendo no lugar da amostra água destilada.

Foi preparada uma curva padrão com L-ramnose, utilizando concentrações entre 0,8 e 10 g/L.

Para a certificação de que o carboidrato que estava sendo quantificado era o ramnolipídeo produzido pelo isolado e não algum açúcar residual presente no meio de cultura, foi realizado o teste de glicemia enzimática, utilizando *kit* da marca Wiener Lab, que é específico para quantificação de glicose.

### **3.8.4 Concentração Micelar Crítica (CMC)**

A quantidade de surfactante necessária para atingir a mais baixa tensão superficial possível, é definida como a concentração micelar crítica (Zhang & Miller, 1992). Este parâmetro foi medido, para determinar qual concentração do extrato seria necessária para atingir este objetivo. Foram realizadas diluições seriais de,



0,059 até 5,9 mg/l do extrato, em tampão fosfato pH 7,2, até atingir a concentração micelar crítica, onde a tensão superficial atinge um platô e não diminui mais.

### **3.9 Degradação com adição de 0,1% de extrato de levedura e 0,2% de glicose**

A degradação da gasolina comercial foi testada utilizando meio mineral (Apêndice 8.1.1) e 0,2% de glicose ou 0,1% extrato de levedura. O inóculo foi obtido de acordo com item 3.3, e o ensaio foi realizado em frascos hermeticamente fechados, sob agitação orbital (150 rpm) a 30 °C, durante 72 horas. A degradação dos compostos BTX e etanol, foi analisada por cromatografia gasosa, de acordo com o item 3.7.

### **3.10 Análise estatística**

As médias das triplicatas e duplicatas obtidas neste trabalho foram submetidas a análises de desvio padrão.

Foi realizada análise estatística com os seguintes dados: variação da área dos picos obtidos na análise cromatográfica, capacidade de emulsificação e redução de tensão resultantes do crescimento de isolados nos diferentes meios de cultura avaliados e diferença da redução de tensão nos consórcios. O teste utilizado foi comparação entre as médias pelo teste t de Turkey, com nível de confiança de 95%, utilizando o programa Statistica 7.1.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Coleta e isolamento

Os locais das coletas foram uma área com histórico de disposição de resíduos petroquímicos (*landfarming*) da Copesul e de uma caixa separadora de água-gasolina de um posto de combustíveis, em Porto Alegre que estava sendo remediado pela técnica de extração multifásica (Tabela 1).

A degradação de hidrocarbonetos recalcitrantes por microrganismos envolve capacidade metabólica especializada. Em ambientes poluídos, microrganismos especializados são abundantes, devido às adaptações que a microbiota, destes locais, passa quando em contato com estes poluentes (Marchal et al., 2003). Os microrganismos presentes nestes locais, devido a pressão de seleção, provavelmente possuem potencial enzimático para a degradação das frações da gasolina de interesse, no presente trabalho. Neste sentido, foi possível isolar 79 microrganismos da área de disposição de resíduos petroquímicos e 52 da caixa separadora água/gasolina do posto de abastecimento de combustíveis (Apêndice 8.4).

## **4.2 Avaliação da capacidade de degradação preliminar da gasolina e derivados**

A avaliação preliminar do crescimento microbiano em gasolina comercial com etanol (G c/ E), gasolina pura sem etanol (G s/ E), benzeno (P.A), tolueno (P.A) e xilenos (P.A), como única fonte de carbono, foi realizada em meio mineral, utilizando o indicador redox cloreto de trifeniltetrazólio (TTC). Os sais de tetrazólio competem com outros aceptores de elétrons pelo poder redutor da cadeia de transporte de elétrons. Desta forma, a redução dos sais de tetrazólio para trifenilformazam, irão refletir a atividade da cadeia de transporte de elétrons (mudança de coloração para roxo) (Maier et al., 2000). As culturas foram incubadas durante 72 horas, a 30°C, sob agitação orbital em frascos hermeticamente fechados (Tabela 1). Desta forma, a mudança na coloração do meio de cultura, de transparente para roxo/rosa, através da redução do TTC pelo microrganismo, pode informar sobre a oxidação do substrato utilizado. Esta técnica já foi utilizada por outros pesquisadores (Hanson et al., 1993; Souza et al., 2004; Pirôlo, 2006).

Desta forma dos 131 isolados, 125 foram capazes de crescer individualmente em gasolina comercial (24% de etanol). Os 6 isolados que não foram capazes de crescer, quando testados individualmente neste substrato, provavelmente, só possuem capacidade de metabolizar metabólitos secundários que são excretados por outras cepas, quando em consórcios.

Apenas 56 isolados (45%) foram capazes de metabolizar a gasolina pura, sugerindo que os outros 75 isolados estavam utilizando o etanol, como fonte de carbono. Os isolados que cresceram somente em gasolina comum, podem ter

capacidade enzimática para degradar os outros componentes da gasolina, no entanto necessitavam de uma fonte de carbono mais prontamente disponível, como o etanol, para iniciar a degradação dos outros componentes da gasolina. A degradação preferencial do etanol já foi verificada por outros autores (Corseuil et al., 1998; Powers et al., 2001; Dakhel et al., 2003).

Foi avaliada a capacidade dos isolados que cresceram em gasolina sem etanol em metabolizar benzeno, tolueno, xileno e a mistura destes 3 hidrocarbonetos. Dos 56 isolados, 42 cresceram na mistura BTX. Quando testados separadamente, 30 cresceram em tolueno, 23 em xileno e 17 em benzeno. De acordo com o presente trabalho, o tolueno é o composto aromático mais comumente degradado pela microbiota. Outros autores concordam com este dado (Gulensoy & Alvarez, 1999; Lapertot et al., 2007; Shim et al., 2002). Ridgway, et al. (1990) isolaram 297 bactérias degradadoras de gasolina, de um aquífero contaminado com este combustível. Realizando testes de crescimento bacteriano, em vapores de diferentes substratos, presentes na gasolina, observaram que o tolueno, foi o hidrocarboneto mais freqüentemente metabolizado, aproximadamente 75% dos isolados, utilizaram este hidrocarboneto como fonte de carbono, seguido pelo p-xileno, no entanto sua forma isomérica o o-xileno, foi degradado com menor freqüência, assim como o benzeno.

Alguns isolados, foram capazes somente de metabolizar os compostos aromáticos individualmente (50 mg/L), sugerindo que a mistura (90 mg/L), com uma concentração maior de hidrocarbonetos, pode ter sido tóxica para estes isolados. As cepas UFRGS98 e UFRGS104 confirmam esta possibilidade, porque apresentaram

crescimento nas três fontes de carbono, apenas em ensaios individualizados destes substratos. Os isolados UFRGS45, UFRGS82 e UFRGS113 não apresentaram crescimento em benzeno, provavelmente porque este hidrocarboneto é considerado o mais tóxico entre os monoaromáticos BTXE (Senzolo et al., 2000). No entanto, os isolados UFRGS67, UFRGS105, UFRGS115 e UFRGS131 foram uma exceção, porque cresceram apenas na presença de benzeno, sugerindo uma adaptação enzimática a este substrato (Witzig et al. 2006).

Os isolados UFRGS34 e UFRGS46, cresceram na mistura de BTX, no entanto não cresceram quando os três hidrocarbonetos foram testados individualmente. Este comportamento sugere uma interação entre os compostos aromáticos, durante o processo de degradação. Este tipo de interação já foi observada entre diversos hidrocarbonetos derivados do petróleo (Solano-Serena et al., 2000; Marchal et al., 2003; Lapertot et al., 2007).

**Tabela 1.** Avaliação preliminar das fontes de carbono utilizadas pelos isolados: gasolina comercial, gasolina pura, benzeno, tolueno e xilenos, em meio mineral e TTC, durante 72 horas, a 30°C. As células assinaladas com um X indicam que o isolado, utilizou esta fonte de carbono. A ultima coluna à direita, mostra a origem do isolado, *landfarming* (L) ou posto de combustíveis (PC).

Isolados	G c/ A	G s/ A	BTX	B	T	X	Origem
UFRGS1	X						L
UFRGS2							L
UFRGS3	X						L
UFRGS4	X	X	X			X	L
UFRGS5	X						L
UFRGS6	X						L
UFRGS7	X	X	X	X	X		PC
UFRGS8	X						PC
UFRGS9	X	X	X		X		PC
UFRGS10	X						PC
UFRGS11	X	X	X	X		X	PC
UFRGS12	X						PC
UFRGS13	X	X	X		X		L
UFRGS14	X						L
UFRGS15	X	X	X		X		L
UFRGS16							L
UFRGS17	X						L
UFRGS18	X	X					L
UFRGS19	X	X					L
UFRGS20	X	X					L
UFRGS21	X						L
UFRGS22	X						L
UFRGS23	X						L
UFRGS24							L
UFRGS25	X	X	X	X	X		L
UFRGS26	X	X					L
UFRGS27	X	X					L
UFRGS28	X						L
UFRGS29	X						L
UFRGS30	X						L
UFRGS31	X	X	X	X	X	X	L
UFRGS32	X						L
UFRGS33	X						L
UFRGS34	X	X	X				L
UFRGS35	X	X	X		X		L
UFRGS36	X						L
UFRGS37	X						PC
UFRGS38	X	X			X		PC
UFRGS39	X						PC
UFRGS40	X	X	X	X		X	PC
UFRGS41	X	X				X	PC
UFRGS42	X						PC
UFRGS43	X						PC
UFRGS44	X	X	X			X	PC

(G c/ E) Gasolina com etanol, (G s/ E) Gasolina pura, (BTX) Benzeno, tolueno e xilenos, (B) benzeno, (T) tolueno (X) xilenos.

**Continuação Tabela 1.** Avaliação preliminar das fontes de carbono utilizadas pelos isolados: gasolina comercial, gasolina pura, benzeno, tolueno e xilenos, em meio mineral e TTC, durante 72 horas, a 30°C. As células assinaladas com um X indicam que o isolado, foi capaz de utilizar esta fonte de carbono. A ultima coluna à direita, mostra a origem do isolado, *landfarming* (L) ou posto de combustíveis (PC).

UFRGS45	X	X	X		X	X	PC
UFRGS46	X	X	X				L
UFRGS47	X						L
UFRGS48	X	X	X		X		L
UFRGS49	X	X	X		X		L
UFRGS50	X						L
UFRGS51							L
UFRGS52	X						L
UFRGS53	X	X					L
UFRGS54	X	X	X			X	L
UFRGS55	X	X	X			X	L
UFRGS56	X						L
UFRGS57	X						L
UFRGS58	X						L
UFRGS59	X						L
UFRGS60	X	X	X		X		L
UFRGS61	X	X	X	X	X	X	L
UFRGS62	X	X	X	X	X	X	L
UFRGS63	X	X	X	X	X	X	L
UFRGS64							L
UFRGS65	X						L
UFRGS66	X	X	X			X	L
UFRGS67	X	X	X	X			L
UFRGS68	X	X	X	X	X	X	L
UFRGS69	X						L
UFRGS70	X						L
UFRGS71	X						L
UFRGS72	X						L
UFRGS73	X						L
UFRGS74	X						L
UFRGS75	X	X	X		X		L
UFRGS76	X						L
UFRGS77	X						L
UFRGS78	X	X	X		X		L
UFRGS79	X	X	X		X		L
UFRGS80	X						L
UFRGS81	X						L
UFRGS82	X	X			X	X	L
UFRGS83	X						L
UFRGS84	X						L
UFRGS85	X						L
UFRGS86	X						L
UFRGS87	X						L
UFRGS88	X						L

(G c/ E) Gasolina com etanol, (G s/ E) Gasolina pura, (BTX) Benzeno, tolueno e xilenos, (B) benzeno, (T) tolueno (X) xilenos.

**Continuação Tabela 1.** Avaliação preliminar das fontes de carbono utilizadas pelos isolados: gasolina comercial, gasolina pura, benzeno, tolueno e xilenos, em meio mineral e TTC, durante 72 horas, a 30°C. As células assinaladas com um X indicam que o isolado, foi capaz de utilizar esta fonte de carbono. A ultima coluna à direita, mostra a origem do isolado, *landfarming* (L) ou posto de combustíveis (PC).

UFRGS89	X	X					L
UFRGS90	X						L
UFRGS91	X	X					L
UFRGS92	X	X					L
UFRGS93	X						L
UFRGS94	X						L
UFRGS95	X	X					PC
UFRGS96	X						PC
UFRGS97	X						PC
UFRGS98	X			X	X	X	PC
UFRGS99	X	X	X	X	X	X	PC
UFRGS100	X	X	X	X	X	X	PC
UFRGS101	X						PC
UFRGS102	X						PC
UFRGS103	X						PC
UFRGS104	X	X		X	X	X	PC
UFRGS105	X	X	X	X			PC
UFRGS106	X						PC
UFRGS107	X	X	X			X	PC
UFRGS108	X	X	X			X	PC
UFRGS109	X						PC
UFRGS110	X						PC
UFRGS111	X						PC
UFRGS112	X						PC
UFRGS113	X	X	X		X	X	PC
UFRGS114	X	X	X			X	PC
UFRGS115	X	X	X	X			PC
UFRGS116	X	X	X		X		PC
UFRGS117	X						PC
UFRGS118	X						PC
UFRGS119							PC
UFRGS120	X	X	X		X		PC
UFRGS121	X						PC
UFRGS122	X						PC
UFRGS123	X						PC
UFRGS124	X						PC
UFRGS125	X						PC
UFRGS126	X	X	X		X		PC
UFRGS127	X						PC
UFRGS128	X	X	X		X		PC
UFRGS129	X	X	X		X		PC
UFRGS130	X						PC
UFRGS131	X	X		X			PC

(G c/ E) Gasolina com etanol, (G s/ E) Gasolina pura, (BTX) Benzeno, tolueno e xilenos, (B) benzeno, (T) tolueno (X) xilenos.



### 4.3 Avaliação da capacidade de produção de biossurfactantes

A avaliação da produção de biossurfactantes foi realizada através do teste colorimétrico e das medidas do índice de emulsificação e da tensão superficial do meio de cultura (Tabela 2). Para as medidas da tensão superficial e emulsificação, foram utilizadas culturas onde a única fonte de carbono presente era a gasolina comercial, incubadas durante 72 horas, a 30°C.

O teste colorimétrico é baseado na formação de um agregado insolúvel entre o surfactante catiônico brometo de cetilmetilamônio, o corante básico azul de metileno e o biossurfactante aniônico, produzido pelo microrganismo (Siegmund e Wagner, 1991). Esta técnica é específica para a detecção de surfactantes aniônicos, como por exemplo os sophorolipídeos, produzidos por *Candida spp* e os ramnolipídeos, produzidos por *Pseudomonas spp*. Já foi utilizada por outros autores para avaliar a capacidade de produção deste tipo de biossurfactante (Siegmund e Wagner, 1991; Bodour & Maier, 2002; Gunther et al., 2004).

Com relação as medidas obtidas no índice de emulsificação, foi utilizada a gasolina como composto hidrofóbico, neste ensaio. Uma vez que a intensidade da emulsificação é maior quando utilizado o mesmo hidrocarboneto que foi empregado na síntese do biossurfactante (Perfumo et al., 2006). O experimento foi realizado empregando, tanto a cultura, com células ou o sobrenadante, porque os biossurfactantes podem ser extracelulares, causando a emulsificação do hidrocarboneto fora da célula e/ou estar associado à parede celular, facilitando a penetração da fonte de carbono no espaço periplasmático (Koch et al., 1991).

A propriedade de todo o surfactante é sua capacidade em reduzir a

tensão superficial de um meio líquido (Zhang & Miller, 1992). Por exemplo, a água destilada apresenta uma tensão superficial de 73 mN/m. Um surfactante efetivo produzido por microrganismos (biossurfactante), pode reduzir este valor para 30 mN/m ou menos. Por esta razão, esta técnica tem sido muito utilizada em estudos que envolvem a detecção de biossurfactantes (Reisfeld et al., 1972; Reiling et al., 1986; Muriel et al., 1996; Bardi et al., 2000; Nitschke et al., 2005; Lee et al., 2007; Jacques et al., 2008).

**Tabela 2.** Avaliação preliminar da produção de biossurfactantes. Tensão superficial em mN/m (TS), emulsificação da gasolina utilizando a cultura (EC/) e o sobrenadante (ES) e teste colorimétrico (TC). Para as medidas da tensão superficial e emulsificação, foram empregadas culturas onde a única fonte de carbono presente era a gasolina comercial, incubadas durante 72 horas, a 30°C. A última coluna à direita, mostra a origem do isolado, *landfarming* (L) ou posto de combustíveis (PC).

Isolados	T S	EC	ES	T.C	Origem
UFRGS1	56,9	-	-	+	L
UFRGS2	-	-	-		L
UFRGS3	47,3	***	**		L
UFRGS4	56,7	**	**		L
UFRGS5	47,2	**			L
UFRGS6	51,7	**			L
UFRGS7	43,7	***	**		PC
UFRGS8	55,7	***	*	+	PC
UFRGS9	52,2	**	**		PC
UFRGS10	51,0	*	*		PC
UFRGS11	43,2	***	**		PC
UFRGS12	54,7	*	*		PC
UFRGS13	48,1	**	**		L
UFRGS14	55,0	**	**		L
UFRGS15	49,7	**	**		L
UFRGS16	-				L
UFRGS17	52,4	**	*		L
UFRGS18	52,6	**	*		L
UFRGS19	54,3				L
UFRGS20	48,6	**		+	L
UFRGS21	55,4			+	L
UFRGS22	55,5	**	**		L
UFRGS23	51,7	***	***		L
UFRGS24	-				L

Os asteriscos indicam a intensidade da emulsificação da gasolina: (-) sem emulsificação; (\*) emulsificação entre 5-20%; (\*\*) emulsificação entre 21-40%; (\*\*\*) emulsificação entre 41-60%.

**Continuação Tabela 2.** Avaliação preliminar da produção de biossurfactantes. Tensão superficial em mN/m (TS), emulsificação da gasolina utilizando a cultura (EC/) e o sobrenadante (ES) e teste colorimétrico (TC). Para as medidas da tensão superficial e emulsificação, foram empregadas culturas onde a única fonte de carbono presente era a gasolina comercial, incubadas durante 72 horas, a 30°C. A última coluna à direita, mostra a origem do isolado, *landfarming* (L) ou posto de combustíveis (PC).

UFRGS25	50,1	***	***		L
UFRGS26	59,1	**	**	+	L
UFRGS27	50,4				L
UFRGS28	38,0	***	***	+	L
UFRGS29	41,0	*		+	L
UFRGS30	54,3	**	**		L
UFRGS31	52,4				L
UFRGS32	55,1	***	***		L
UFRGS33	55,4				L
UFRGS34	49,0	*			L
UFRGS35	53,6				L
UFRGS36	52,2	**	**		L
UFRGS37	56,7				PC
UFRGS38	33,4	***	***	+	PC
UFRGS39	53,6				PC
UFRGS40	59,2				PC
UFRGS41	53,7				PC
UFRGS42	48,0				PC
UFRGS43	53,1				PC
UFRGS44	53,8	**	**		PC
UFRGS45	60,8	*	*		PC
UFRGS46	48,0	***	***		L
UFRGS47	53,6	***	**		L
UFRGS48	50,7	***	***		L
UFRGS49	46,3	***	***		L
UFRGS50	54,2	***	***		L
UFRGS51	-				L
UFRGS52	50,9	***	**		L
UFRGS53	55,4	**	**		L
UFRGS54	49,1	***	***		L
UFRGS55	53,8	***	-		L
UFRGS56	46,3	**	***		L
UFRGS57	48,1	***	**		L
UFRGS58	62,1	*	-		L
UFRGS59	53,6	***	***		L
UFRGS60	54,0	*	*		L
UFRGS61	48,5	**	**		L
UFRGS62	61,1	***	**		L
UFRGS63	53,0	***	**		L
UFRGS64	-				L
UFRGS65	46,9	***	***		L
UFRGS66	51,7	***	**		L
UFRGS67	58,9	**	*		L
UFRGS68	57,2	***	***		L

Os asteriscos indicam a intensidade da emulsificação da gasolina: (-) sem emulsificação; (\*) emulsificação entre 5-20%; (\*\*) entre 21-40%; (\*\*\*) entre 41-60%.

**Continuação Tabela 2.** Avaliação preliminar da produção de biossurfactantes. Tensão superficial em mN/m (TS), emulsificação da gasolina utilizando a cultura (EC/) e o sobrenadante (ES) e teste colorimétrico (TC). Para as medidas da tensão superficial e emulsificação, foram empregadas culturas onde a única fonte de carbono presente era a gasolina comercial, incubadas durante 72 horas, a 30°C. A última coluna à direita, mostra a origem do isolado, *landfarming* (L) ou posto de combustíveis (PC).

UFRGS69	51,5	-	*		L
UFRGS70	49,5	-	*		L
UFRGS71	51,1	***	***		L
UFRGS72	55,0	***	**		L
UFRGS73	57,6	***	**		L
UFRGS74	48,9	**	-		L
UFRGS75	40,7	-	**	+	L
UFRGS76	57,0	***	***		L
UFRGS77	49,9	-	-		L
UFRGS78	56,2	-	-		L
UFRGS79	62,0	**	-		L
UFRGS80	52,8	*	*		L
UFRGS81	42,6				L
UFRGS82	46,8	**	**		L
UFRGS83	45,6	**	**		L
UFRGS84	50,7	**	-		L
UFRGS85	55,2	**	-		L
UFRGS86	54,8	**	*		L
UFRGS87	48,1	***	***		L
UFRGS88	34,7	*	*		L
UFRGS89	48,9	-	-		L
UFRGS90	50,5	***	***		L
UFRGS91	45,9	*	*		L
UFRGS92	46,9	**	*		L
UFRGS93	59,5	-	-		L
UFRGS94	49,7	***	**		L
UFRGS95	39,9	**		+	PC
UFRGS96	32,4	*	***	+	PC
UFRGS97	34,7	***	***	+	PC
UFRGS98	32,9	***	***	+	PC
UFRGS99	54,3	***	**		PC
UFRGS100	53,2				PC
UFRGS101	33,9	***	***	+	PC
UFRGS102	43,0		*	+	PC
UFRGS103	32,7	***	***	+	PC
UFRGS104	49,3				PC
UFRGS105	52,6	***	***		PC
UFRGS106	49,5	***	***		PC
UFRGS107	46,2	***	**		PC
UFRGS108	50,5				PC
UFRGS109	57,4	**	*		PC
UFRGS110	46,9	***	**		PC
UFRGS111	46,5	**	*		PC

Os asteriscos indicam a intensidade da emulsificação da gasolina: (-) sem emulsificação; (\*) emulsificação entre 5-20%; (\*\*) emulsificação entre 21-40%; (\*\*\*) emulsificação entre 41-60%.

**Continuação Tabela 2.** Avaliação preliminar da produção de biossurfactantes. Tensão superficial em mN/m (TS), emulsificação da gasolina utilizando a cultura (EC/) e o sobrenadante (ES) e teste colorimétrico (TC). Para as medidas da tensão superficial e emulsificação, foram empregadas culturas onde a única fonte de carbono presente era a gasolina comercial, incubadas durante 72 horas, a 30°C. A última coluna à direita, mostra a origem do isolado, *landfarming* (L) ou posto de combustíveis (PC).

UFRGS112	50,3	**	*		PC
UFRGS113	45,2	*	**		PC
UFRGS114	50,1	***	***		PC
UFRGS115	48,5	***	***		PC
UFRGS116	56,6	***	**	+	PC
UFRGS117	55,6	***	**		PC
UFRGS118	54,8		**		PC
UFRGS119	-				PC
UFRGS120	52,9	***	**		PC
UFRGS121	50,7	**	*	+	PC
UFRGS122	42,2	*		+	PC
UFRGS123	38,3	***	***	+	PC
UFRGS124	41,2	*	*	+	PC
UFRGS125	41,1	**	*	+	PC
UFRGS126	50,6	**	*	+	PC
UFRGS127	54,4	**	***		PC
UFRGS128	39,8	*		+	PC
UFRGS129	53,0	***	***		PC
UFRGS130	57,2	**	*		PC
UFRGS131	53,6	***	***		PC

Os asteriscos indicam a intensidade da emulsificação da gasolina: (-) sem emulsificação; (\*) emulsificação entre 5-20%; (\*\*) emulsificação entre 21-40%; (\*\*\*) emulsificação entre 41-60%.

Segundo Willumsem e Karlson (1997) um bom biossurfactante é capaz de reduzir a medida da tensão superficial do meio em 20 unidades, comparado com a água destilada, ou seja, valores inferiores a 50 mN/m, são considerados satisfatórios. No presente trabalho foi definido que um isolado que reduzisse a medida da tensão para valores inferiores a 40 mN/m, seria considerado um microrganismo bom produtor de biossurfactantes, este critério concorda com o trabalho de Youssef et al. (2004) e Haba et al. (2000).

Onze isolados foram capazes de reduzir a tensão do meio de cultura, de forma efetiva, destes 4 isolados obtiveram resultados entre 38 e 39,9 mN/m e 7

isolados valores entre 32,4 e 34,7 mN/m. A medida de tensão superficial do controle, meio mineral com gasolina, permaneceu entre 61 e 64,5 mN/m durante o experimento.

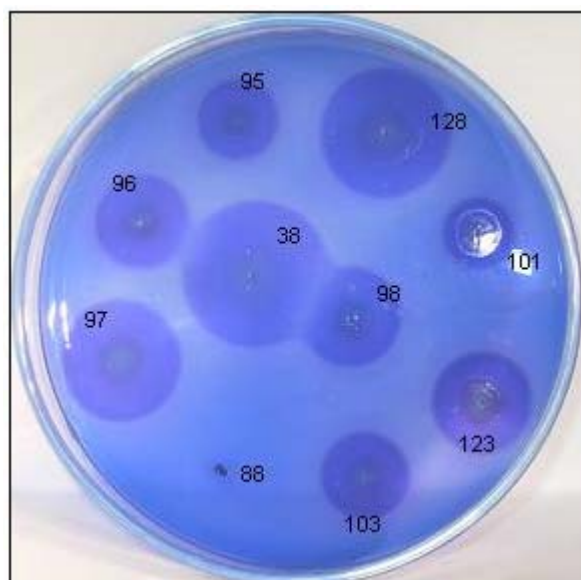
Haba et al. (2000) estudaram a produção de biossurfactantes em diferentes gêneros e espécies de microrganismos, utilizando como substrato óleo de oliva usado, os experimentos foram conduzidos durante 72 horas em frascos Erlenmeyer. O gênero *Pseudomonas* apresentou melhores resultados de diminuição da medida da tensão superficial do meio, das 10 cepas testadas, 6 obtiveram resultados entre 32 e 36,5 mN/m. Também foram testadas 4 espécies de *Bacillus spp*, um deles reduziu a medida da tensão superficial para 32 mN/m os outros, para valores acima de 38 mN/m, 3 cepas de *Rhodococcus spp*, onde apenas 1 reduziu a tensão para 34 mN/m, um isolado de *Acinetobacter sp* que reduziu a medida para 38 mN/m, 6 espécies de *Cândida spp*, onde dois isolados obtiveram valor de 35 mN/m e os demais para medidas acima de 39 mN/m. Já os isolados de *Staphylococcus sp*, *Arthrobacter sp* e *Micrococcus sp*, não reduziram a tensão do meio.

Com relação ao índice de emulsificação, foi definido um código de acordo com o tamanho da emulsificação que o microrganismo era capaz de realizar, para facilitar a comparação entre os isolados. Foram definidos três níveis: (\*) emulsificação entre 5 e 20%, (\*\*) emulsificação entre 21 e 40% e (\*\*\*) emulsificação entre 41 e 60%.

Foi observado que 104 (79%) isolados foram capazes de produzir algum nível de emulsificação (Tabela 2), 48 (37%) isolados demonstraram alta capacidade de emulsificação da gasolina, quando utilizada a cultura com células e 31 (24%)

quando utilizado o sobrenadante. Uma alta capacidade de emulsificação também foi observada por Cunha et al., (2004) onde 31% dos isolados, crescendo em gasolina comercial, apresentaram alta capacidade (100%) de emulsificação deste hidrocarboneto. Outros trabalhos avaliaram a produção de biossurfactantes através da capacidade de emulsificação, com óleo diesel (Bicca et al., 1999, Bento et al., 2005), com gasolina (Cunha et al., 2004) e querosene (Muriel et al., 1996; Haba et al., 2000; Tuleva et al., 2004).

Quanto ao teste colorimétrico 24 isolados apresentaram resultado positivo (Figura 4). Indicando que estes isolados estão produzindo surfactantes aniônicos, como por exemplo os ramnolípídeos, produzidos por *Pseudomonas spp.* (Bodour & Maier, 2002; Tuleva et al., 2002; Gunther et al., 2004; Bento et al., 2005; Perfumo et al, 2006).



**Figura 4.** Teste colorimétrico para os isolados UFRGS38, UFRGS95, UFRGS96, UFRGS97, UFRGS98, UFRGS101, UFRGS103, UFRGS123 e UFRGS128 com resultados positivos e UFRGS88 com resultado negativo. A inoculação foi realizada por picada e a incubação em estufa a 30 °C, por 72 horas.

Os isolados UFRGS38, UFRGS96, UFRGS97, UFRGS98, UFRGS101, UFRGS103 e UFRGS123 reduziram as medidas de tensão superficial do meio de cultura para valores inferiores a 40 mN/m, demonstraram alta capacidade de emulsificação e obtiveram resultados positivos no teste colorimétrico, portanto, foram escolhidos para os próximos ensaios com análises da degradação e cinética de crescimento comparada a produção de biossurfactantes. Os isolados UFRGS95 e UFRGS128, também foram selecionados, para testes de degradação, apesar de não terem apresentado resultados satisfatórios de emulsificação, eles foram capazes de crescer em diferentes fontes de carbono, como a gasolina com e sem a adição de etanol e o isolado UFRGS128, também se desenvolveu na mistura de BTX e em tolueno (P.A.).

#### **4.4 Análise da cinética de crescimento e produção de biossurfactantes**

Os isolados capazes de, crescer em meio mineral com 1 % de gasolina comercial, formar emulsificação significativa e reduzir a medida de tensão do meio de cultura, para valores inferiores a 40 mN/m, foram selecionados, para esta análise. Para cada ponto da curva, de 72 horas, foi feito um frasco hermeticamente fechado como controle (Figura 12), contendo meio mineral e 1% de gasolina comercial, onde foram acompanhadas as medidas de tensão superficial e crescimento bacteriano estimado pela densidade ótica.

As medidas de tensão superficial do controle (Figura 12), variaram entre 47 e 69 mN/m, portanto foi considerado como início da produção do biossurfactante,



quando o isolado reduziu a tensão do meio para valores inferiores a 47 mN/m. O valor de tensão inicial baixo (inferior a 50 mN/m) observado no ponto inicial de várias das curvas, inclusive no controle, pode ter ocorrido devido a presença álcool na gasolina comercial, um conhecido surfactante que pode ter migrado e provocado esta redução no início dos experimentos (equilíbrio de fases).

Outros autores, durante a condução de análises, também observaram resultados de medida da tensão inicial baixa, em seus experimentos. Raza et al. (2006), utilizando meio mineral e resíduos de óleo, detectaram em seu primeiro ponto de coleta, a medida de 41 mN/m. De acordo com o autor, a agregação coloidal das proteínas, óleos residuais e material particulado, existentes no meio de cultura, podem provocar redução na tensão superficial.

Observou-se que a maioria dos isolados mostrou durante as primeiras 16 horas de cultivo fase lag, com exceção dos isolados UFRGS96 (Figura 6), UFRGS97 (Figura 7) e UFRGS101 (Figura 9) que obtiveram um aumento na absorbância já nas primeiras 8 horas de cultivo (UFRGS38 (Figura 5), UFRGS98 (Figura 8), UFRGS103 (Figura 10) e UFRGS123 (Figura 11)).

Os microrganismos que mostraram uma fase lag curta, poderiam estar utilizando fontes de carbono mais facilmente assimiláveis, presentes na gasolina, para o seu crescimento ou ainda existe a possibilidade da utilização de alguma substância de reserva. Por outro lado, os isolados que apresentaram fase lag longa, sugerindo uma fase de adaptação, poderiam estar sintetizando enzimas necessárias para a degradação de compostos mais recalcitrantes da gasolina. Podemos sugerir que o isolado UFRGS96, que mostrou duas fases lags, degradou preferencialmente

o etanol e após a exaustão desta fonte de carbono, apresentou mais uma fase de adaptação, onde provavelmente realizou a síntese de enzimas para a degradação de compostos mais recalcitrantes.

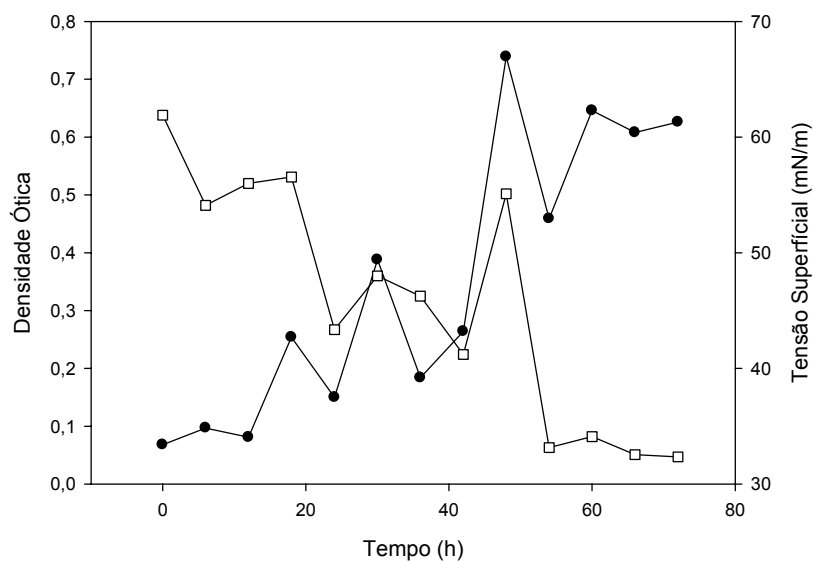
Segundo a literatura as enzimas responsáveis pela degradação do etanol são constitutivas, portanto são sempre sintetizados pelos microrganismos, fazendo com que estes não apresentem uma fase de adaptação. Entretanto, as enzimas capazes de degradar os hidrocarbonetos BTX, são indutivas, fazendo com que os isolados apresentem uma fase de adaptação (Powers et al., 2001; Deeb et al., 2002).

Os isolados UFRGS38, UFRGS98, e UFRGS101 apresentaram fase de crescimento logaritmo longa, 48, 32 e 24 horas respectivamente. Ao contrário os isolados UFRGS97, UFRGS103 e UFRGS123 mostraram fases de crescimento exponencial curtas, 16, 8 e 6 horas respectivamente, após 24 horas de experimento estes isolados não apresentaram maior crescimento. No entanto o isolado UFRGS96, demonstrou duas fases de crescimento logaritmo, a primeira nas 8 horas iniciais do ensaio e a segunda entre 40 e 48 horas.

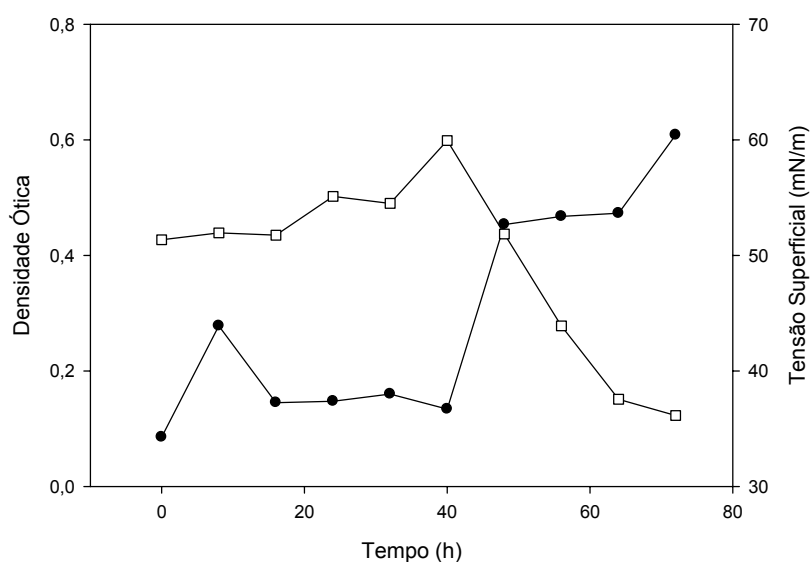
Com base nas medidas de tensão superficial do meio de cultura, dos 7 isolados testados 5 (UFRGS96, UFRGS97, UFRGS98, UFRGS101, UFRGS103) iniciaram a produção de biossurfactantes no início da fase estacionária. O pico de produção, ponto onde a medida da tensão superficial foi a mais baixa detectada, ocorreu na fase estacionária para estes isolados. No entanto 2 isolados (UFRGS123 e UFRGS38) iniciaram a produção na fase logarítmica, o primeiro atingiu o pico de produção ainda na mesma fase e o segundo na fase estacionária.

Haba et al. (2000) observaram a produção de biossurfactantes, em meio mineral suplementado com resíduos de óleos de cozinha, tanto na fase estacionária como na fase exponencial de crescimento celular, no entanto a produtividade na fase estacionária foi 10 vezes maior. Os biossurfactantes ramnolipídicos, por exemplo, são metabólitos secundários produzidos na fase estacionária de crescimento (Zhang e Miller, 1992; Rahma et al., 2002; Raza et al., 2007). No entanto a cepa de *Pseudomonas putida* 21BN produziu ramnolipídeos, tanto na fase logarítmica, como na fase estacionária de crescimento, apesar de ter atingido a maior produção na fase estacionária (Tuleva et al., 2002).

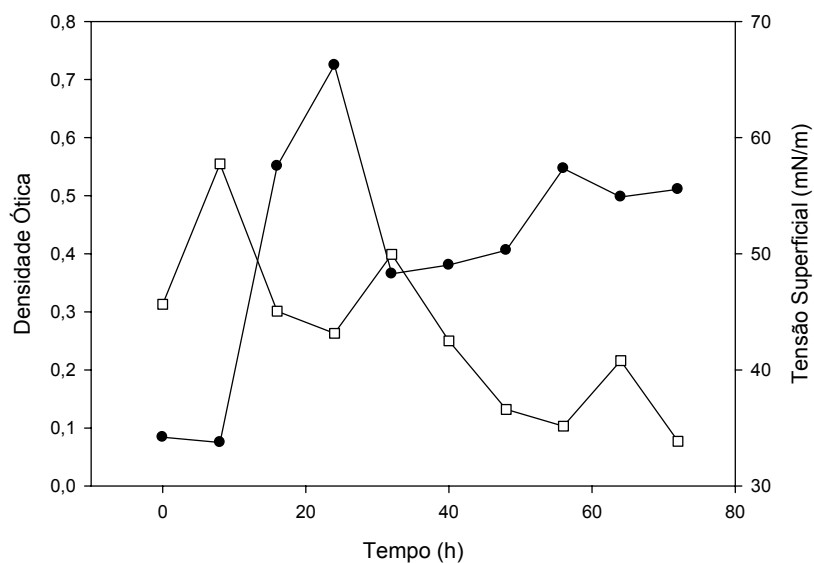
Cunha et al. (2004) utilizaram gasolina com etanol, como única fonte de carbono, para a avaliação da produção de biossurfactantes pela cepa *Serratia sp* SVGG16. O surfactante reduziu a medida de tensão do meio para 34,4 mN/m e obteve índice de emulsificação de 100%, após 4 dias de cultivo. No entanto, neste trabalho os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, desconsiderando as perdas por volatilização da fração BTX e também não foi apresentado o valor inicial das medidas de tensão superficial do meio mineral utilizado.



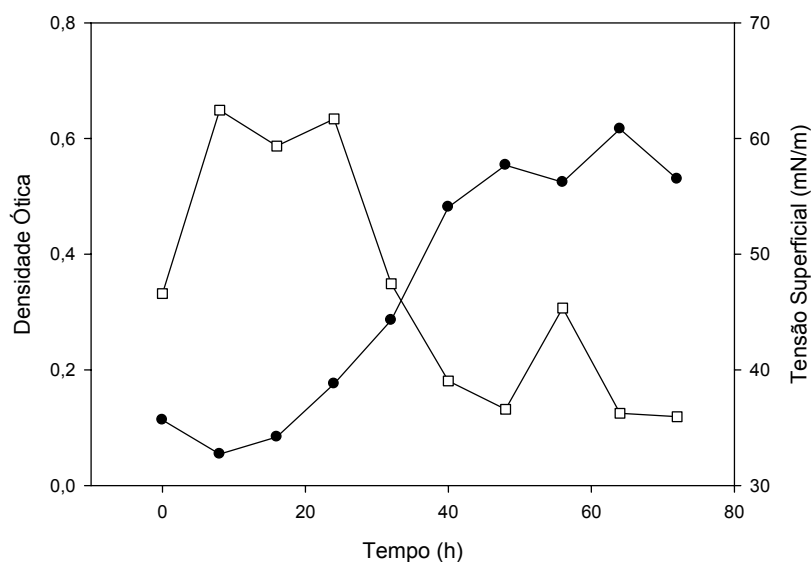
**Figura 5.** Tempo de cultivo e detecção de biosurfactante em frascos hermeticamente fechados. Para o isolado UFRGS38. A curva de produção foi realizada em meio mineral com 1% de gasolina comercial, a 30°C por 72 horas, foram analisadas alíquotas a cada 6 horas. Símbolos: (□) Tensão superficial (mN/m); (•) Densidade ótica (600 nm).



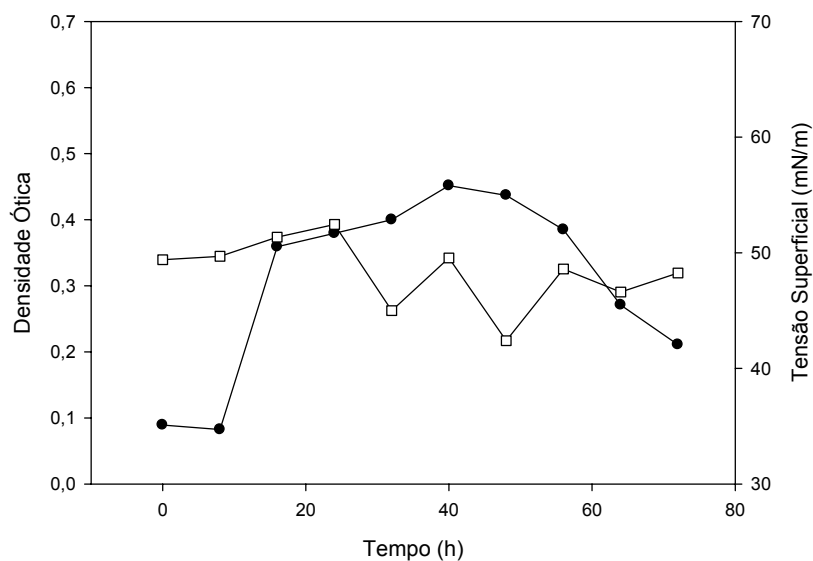
**Figura 6.** Tempo de cultivo e detecção de biosurfactante em frascos hermeticamente fechados. Para o isolado UFRGS96. A curva de produção foi realizada em meio mineral com 1% de gasolina comercial, a 30°C por 72 horas, foram analisadas alíquotas a cada 8 horas. Símbolos: (□) Tensão superficial (mN/m); (•) Densidade ótica (600 nm).



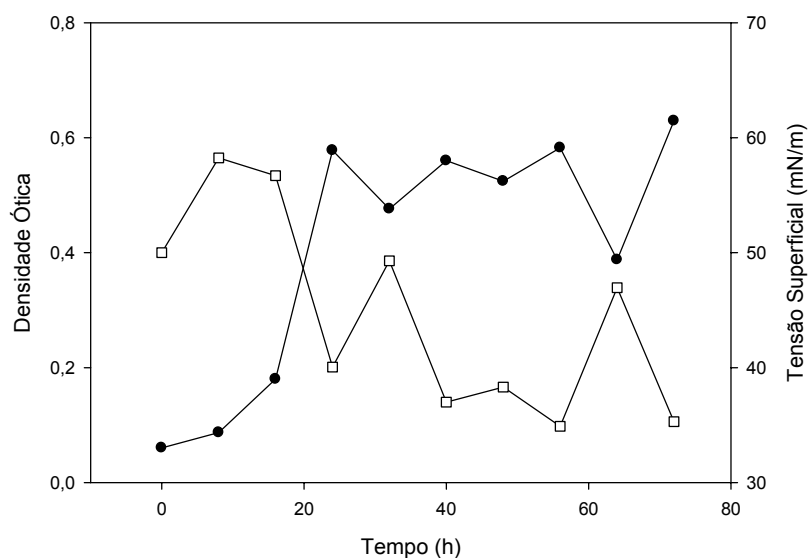
**Figura 7.** Tempo de cultivo e detecção de biossurfactante em frascos hermeticamente fechados. Para o isolado UFRGS97. A curva de produção foi realizada em meio mineral com 1% de gasolina comercial, a 30°C por 72 horas, foram analisadas alíquotas a cada 8 horas. Símbolos: (□) Tensão superficial (mN/m); (•) Densidade ótica (600 nm).



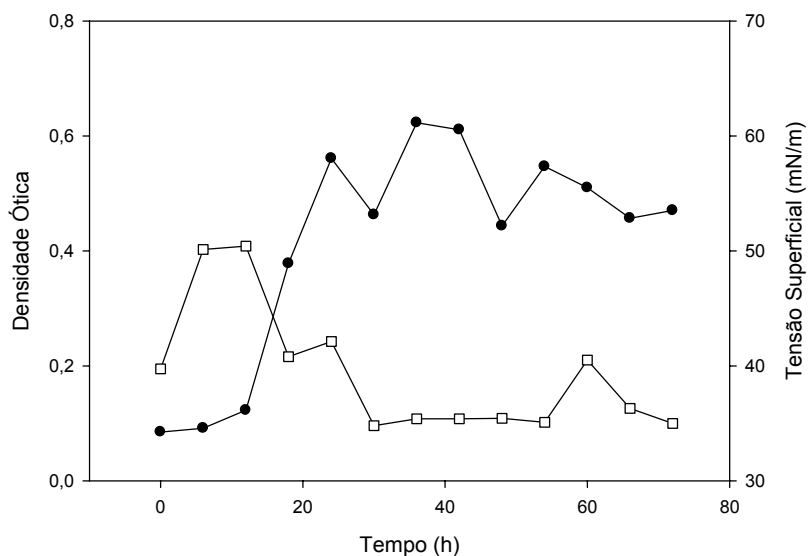
**Figura 8.** Tempo de cultivo e detecção de biossurfactante em frascos hermeticamente fechados. Para o isolado UFRGS98. A curva de produção foi realizada em meio mineral com 1% de gasolina comercial, a 30°C por 72 horas, foram analisadas alíquotas a cada 8 horas. Símbolos: (□) Tensão superficial (mN/m); (•) Densidade ótica (600 nm).



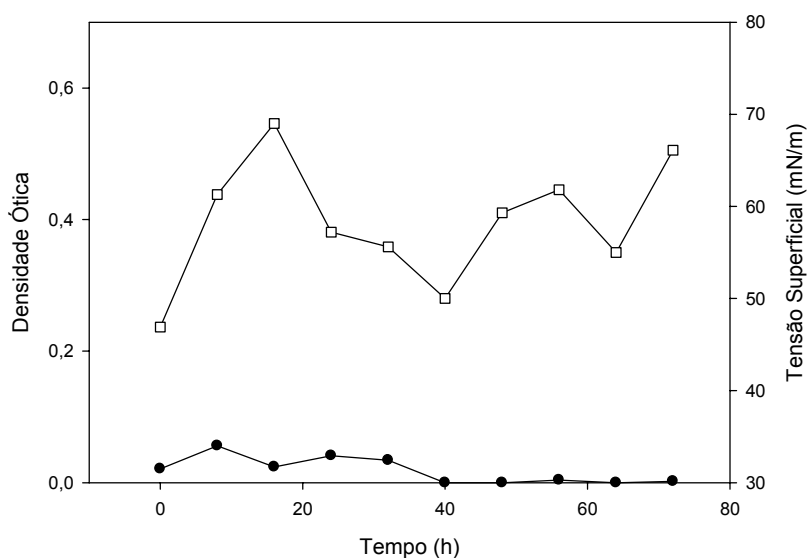
**Figura 9.** Tempo de cultivo e detecção de biossurfactante em frascos hermeticamente fechados. Para o isolado UFRGS101. A curva de produção foi realizada em meio mineral com 1% de gasolina comercial, a 30°C por 72 horas, foram analisadas alíquotas a cada 8 horas. Símbolos: (□) Tensão superficial (mN/m); (•) Densidade ótica (600 nm).



**Figura 10.** Tempo de cultivo e detecção de biossurfactante em frascos hermeticamente fechados. Para o isolado UFRGS103. A curva de produção foi realizada em meio mineral com 1% de gasolina comercial, a 30°C por 72 horas, foram analisadas alíquotas a cada 8 horas. Símbolos: (□) Tensão superficial (mN/m); (•) Densidade ótica (600 nm).



**Figura 11.** Tempo de cultivo e detecção de biossurfactante em frascos hermeticamente fechados. Para o isolado UFRGS123. A curva de produção foi realizada em meio mineral com 1% de gasolina comercial, a 30°C por 72 horas, foram analisadas alíquotas a cada 6 horas. Símbolos: (□) Tensão superficial (mN/m); (•) Densidade ótica (600 nm).



**Figura 12.** Resultados para o controle no ensaio avaliando: tempo de cultivo e detecção de biossurfactante em frascos hermeticamente fechados. A curva de produção foi realizada em meio mineral com 1% de gasolina comercial, a 30°C por 72 horas, foram analisadas alíquotas a cada 8 horas. Símbolos: (□) Tensão superficial (mN/m); (•) Densidade ótica (600 nm).

Foi possível notar uma variação irregular nos valores das análises dos pontos examinados nas curvas, estas diferenças ocorreram porque cada ponto foi retirado de um frasco hermeticamente fechado diferente, e apesar da tentativa durante o preparo do inóculo de se obter o mesmo número de células, alguma variação em cada microcosmo foi inevitável. Portanto, devido a estas circunstâncias, é interessante relacionar a produção do biossurfactante ao crescimento celular, medido em absorbância: os isolados UFRGS38, UFRGS96, UFRGS97 e UFRGS123 demonstraram ótima produção do biossurfactante ( $T < 40$  mN/m) quando atingiram a D.O de 0,4 e os isolados UFRGS98, UFRGS101 e UFRGS103 em 0,5.

#### **4.5 Interações entre microrganismos**

A utilização de estudos envolvendo consórcios de microrganismos degradadores e produtores de biossurfactantes na bioaumentação, pode oferecer um suprimento contínuo de um surfactante não tóxico e biodegradável ao local que esta sendo remediado (Morán et al., 2000). Neste sentido, foi conduzido um experimento com o isolado UFRGS38, caracterizado neste trabalho como bom produtor de ramnolipídeos e com isolados capazes de crescer em gasolina comercial, gasolina pura, benzeno (P.A), tolueno (P.A) e xilenos (P.A) (misturados e individualmente) mas incapazes de produzir biossurfactantes.

Para avaliar a interação entre as espécies, uma vez que é citado na literatura que os ramnolipídeos podem ter atividade antimicrobiana (Benincasa et al., 2004), impedindo o crescimento de alguns microrganismos e também servindo como fonte de carbono (Miller, 1995), inclusive para seus próprios produtores (Mata-



Sandoval et al., 1999).

Os isolados foram incubados em meio mineral suplementado com 1% de gasolina comercial, durante 72 horas, a 30°C. Foram realizadas medidas de tensão superficial no início do experimento, que variaram entre 62,8 e 66,9 mN/m. Após 72 horas de cultivo foram analisados: crescimento celular e medidas da tensão superficial do meio de cultura.

Para avaliar o crescimento do isolado individualmente e em consórcio, com o isolado UFRGS38 produtor de ramnolípido, os experimentos foram conduzidos com os isolados bacterianos separadamente e em combinação com a cepa produtora de biossurfactantes, permitindo assim, uma comparação entre os resultados (Tabela 3).

A presença do isolado UFRGS38 no meio de cultura, promoveu redução significativa nas medidas de tensão superficial, com os isolados UFRGS31, UFRGS61, UFRGS63, UFRGS68 e UFRGS100. No entanto, para os isolados UFRGS62 e UFRGS99 não houve diferença significativa entre a presença do isolado produtor de biossurfactantes e as culturas puras, em relação às medidas de tensão superficial.

As medidas de tensão superficial obtidas após 72 horas, para todos os consórcios não diferiram significativamente entre si. Apenas foi observada diferença significativa entre o consórcio com o isolado UFRGS68, que obteve a menor medida de tensão superficial do experimento (34,6 mN/m) e o isolado UFRGS63, que apresentou o maior valor para medida de tensão encontrado neste experimento (46,25 mN/m).

Os isolados UFRGS31, UFRGS62, UFRGS68 e UFRGS100 demonstraram maior crescimento celular, quando combinados com o isolado UFRGS38, segundo as medidas de densidade ótica. O estímulo no crescimento destes microrganismos pode ter ocorrido em decorrência da presença de biossurfactantes, produzido pelo isolado UFRGS38, no meio de cultura.

Os biossurfactantes podem estimular o crescimento de algumas culturas de microrganismos, como já foi citado na literatura. O rápido crescimento de cepas de *P. aeruginosa* em hexadecano, foi atribuído a produção de biossurfactantes, devido a marcada diminuição na fase lag, durante o período de cultivo, de 60 horas, para menos de 10 horas (Wu & Ju., 1998). Rahman et al. (2002) realizaram ensaios para aumentar a taxa de biodegradação de uma área contaminada com gasolina. Durante seus experimentos, foram adicionados quatro tratamentos, em diferentes combinações: um consórcio bacteriano, resíduos de frango, fibra de côco e ramnolipídeos, a biodegradação foi estimada por espectrofotometria. Seus resultados sugerem que a adição de ramnolipídeos influenciou a biodegradação. Segundo os autores, o material orgânico adicionado, pode ter estimulado a população microbiana, tanto nativa e inoculada, a degradar os hidrocarbonetos, ao passo que, o biossurfactante provavelmente emulsificou os compostos, tornando os hidrocarbonetos prontamente disponíveis a esta população.

Os microrganismos possuem formas diferentes de interação com o substrato. Alguns microrganismos degradam substâncias hidrofóbicas após ligação direta com a gota de hidrocarboneto, normalmente a adição de surfactantes não estimula a degradação, nestas condições (Zhang & Miller, 1994). Estas diferenças

no modo de captação da fonte de carbono, variam de acordo com a espécie ou até, mesmo, com a cepa do microrganismo. Como por exemplo espécies de *Rodococcus erythropolis*, produzem biossurfactantes associados ao envelope celular, por outro lado a adição de biossurfactante no meio de cultura, não influencia a sua captação de hidrocarbonetos (Rapp et al., 1979; Noordman & Janssen, 2002).

Noordman & Janssen (2002) investigaram a influência da adição de biossurfactantes na degradação do hexadecano. Foram testados três diferentes de biossurfactantes: ramnolipídeos produzidos pela cepa *P. aeruginosa* UG2, emulsan produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* RAG1 e trehalose lipídeo produzido pela cepa *Rodococcus erythropolis* DSM 43066. A adição dos biossurfactantes emulsan e trehalose lipídeo, em inóculos puros dos três isolados citados, inibiu a degradação do hexadecano, até mesmo quando adicionado à culturas contendo seus próprios produtores (*Acinetobacter calcoaceticus* RAG1 e *Rodococcus erythropolis* DSM 43066). Ao passo que, a adição de ramnolipídeos estimulou a degradação do hexadecano por seus próprios produtores, mas não influenciou a degradação das outras cepas.

**Tabela 3.** Crescimento celular e medida da tensão superficial dos consórcios (isolado capaz de crescer em todos os substratos e *P. aeruginosa* UFRGS38 produtor de ramnolipídeos) em meio mineral suplementado com 1% de gasolina comercial, após 72 horas de incubação.

Formação de consórcios (degradador de BTX + produtor de ramnolipídeo)				
Isolado	Crescimento celular (abs em 600 nm)		Tensão superficial (mN/m)	
<i>P. aeruginosa</i> UFRGS38	0,507	± 0,007	37,2	± 2,404
UFRGS31	0,499	± 0,004	57	± 1,273
UFRGS31+ <i>P. aeruginosa</i> UFRGS38	0,641	± 0,186	42,9	± 1,273
UFRGS61	0,678	± 0,100	52,8	± 2,263
UFRGS61+ <i>P. aeruginosa</i> UFRGS38	0,517	± 0,001	39,35	± 2,616
<i>B. vietnamiensis</i> UFRGS62	0,575	± 0,094	50,4	± 0,283
<i>B. vietnamiensis</i> UFRGS62 + <i>P. aeruginosa</i> UFRGS38	0,696	± 0,084	44,95	± 2,192
UFRGS63	0,765	± 0,163	52	± 0,848
UFRGS63 + <i>P. aeruginosa</i> UFRGS38	0,612	± 0,057	46,25	± 1,202
UFRGS68	0,245	± 0,052	49,05	± 3,040
UFRGS68 + <i>P. aeruginosa</i> UFRGS38	0,494	± 0,014	34,6	± 1,273
UFRGS99	0,647	± 0,007	54,85	± 2,899
UFRGS99 + <i>P. aeruginosa</i> UFRGS38	0,513	± 0,033	35,65	± 6,435
UFRGS100	0,221	± 0,013	58,35	± 2,051
UFRGS100 + <i>P. aeruginosa</i> UFRGS38	0,377	± 0,065	38,85	± 0,495

A utilização de consórcios pode aumentar a degradação de contaminantes, devido ao efeito sinérgico produzido pela combinação de algumas culturas. Vários trabalhos tem apresentado este efeito, tais como Cunha & Leite (2000) que obtiveram melhores resultados de degradação de alguns constituintes da gasolina, quando inocularam no microcosmo um consórcio de microrganismos, constituído por duas espécies de *Pseudomonas* e uma *Burkholderia cepacia*. Okeke

& Frankenberger (2003) também utilizaram um consórcio para a degradação de metil t-butil éter (MTBE) e Jacques et al., (2008) montaram um consórcio de microrganismos, composto de bactérias e uma espécie de fungo, para a degradação de antraceno, com resultados satisfatórios.

Richard e Vogel (1999) estudaram a dinâmica de degradação do óleo diesel, por um consórcio. O grupo de bactérias era formado por 7 microrganismos dentre eles 5 espécies de *Pseudomonas spp.* A capacidade de degradação também foi testada individualmente para cada isolado, 4 não degradaram nenhum dos hidrocarbonetos testados, nem mesmo co-oxidaram os contaminantes. Entretanto os autores não excluíram a participação destes organismos neste consórcio, eles provavelmente contribuíram de alguma forma para a degradação completa do óleo diesel. Estes componentes do consórcio, que aparentemente, não estavam participando da degradação do óleo diesel, poderiam estar envolvidos na captação dos hidrocarbonetos ou produzindo biossurfactantes, por exemplo. Bento et al. (2004) analisaram a capacidade de um consórcio, isolado de uma área contaminada com óleo diesel, em produzir biossurfactantes. O consórcio constituído por uma espécie de *Actinomyces sp*, uma *Pseudomonas sp* e uma cepa de *Acinetobacter junii*, obteve a menor medida de tensão superficial, 41,4 mN/m e apresentou índice de emulsificação de 64%. Cabe ressaltar que estas medidas foram melhores, do que os valores obtidos para estas culturas puras.

#### 4.5.1 Identificação molecular dos isolados

Com base nos resultados de degradação dos hidrocarbonetos de interesse e produção de biossurfactantes, foi realizado sequenciamento parcial da região 16S do gene do rRNA, para identificação dos isolados. As bactérias escolhidas foram: UFRGS38, UFRGS98 e UFRGS103, porque apresentaram produção de biossurfactantes satisfatória e os isolados UFRGS62 e UFRGS68 porque foram considerados bons degradadores de BTX, de acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa (itens 4.6.1 e 4.6.2).

A análise da seqüência de DNA dos isolados UFRGS38, UFRGS98 e UFRGS103, pariu com 10 seqüências que obtiveram 98 % de homologia, 6 destas seqüências correspondiam a cepas de *P. aeruginosa* e as demais eram relacionadas a outras cepas de *Pseudomonas*. As seqüências dos isolados UFRGS62 e UFRGS68 obtiveram 98% de homologia com o isolado CP000614 *Burkholderia vietnamiensis*.

O gênero *Pseudomonas* tem sido extensivamente utilizado em estudos de biodegradação de derivados do petróleo e produção de biossurfactantes. Raza et al. (2007) utilizaram resíduos de uma refinaria de óleo para a produção de biossurfactantes, por um isolado de *P. aeruginosa*. Rahman et al., (2002) também estudaram a produção de ramnolípídeos a partir de óleos vegetais e glicerol e Jacques et al., (2008) examinaram a produção de biossurfactantes por uma cepa de *P. citronellolis*, durante a degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PHA). Otenio et al., (2005) analisaram a degradação da fração BTX (P.A) pela cepa *P. putida* CCMI 852 e Cunha & Leite, (2000) estudaram a degradação da

gasolina comercial, pelo consórcio de microrganismos formado por uma cepa de *P. putida*, uma *P. alcaligenes* e uma de *Burkholderia cepacia*.

Bactérias do gênero *Burkholderia* já são conhecidas pelo seu considerável potencial biotecnológico como agentes de biorremediação (Cunha & Leite 2000; Okoh et al., 2001; O'Sullivan & Mahenthiralingam, 2005). Kumar et al. (2007) montaram um biorreator para o tratamento de gases de tolueno utilizando uma membrana inoculada com a cepa *Burkholderia vietnamiensis* G4. O biorreator obteve capacidade máxima de eliminação de  $14,4 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , que segundo os autores, é a maior degradação publicada na literatura para estruturas similares. O potencial de degradação do gênero é atribuído a um grande número de elementos de inserção no genoma destes organismos e elementos extracromossomais, como os plasmídeos (Okoh et al., 2001).

#### **4.6 Análise da degradação dos hidrocarbonetos**

Os maiores problemas de contaminação ambiental são atribuídos aos hidrocarbonetos monoaromáticos BTEX que são os constituintes da gasolina mais solúveis e com maior potencial de migração na água subterrânea (Corseuil & Fernandes, 1999). O etanol, por ser um hidrocarboneto alifático e de fácil metabolização pelos microrganismos, pode interferir na degradação de hidrocarbonetos mais recalcitrantes, como os compostos aromáticos. Portanto, os testes realizados nesta etapa avaliaram a capacidade de degradação do etanol e dos três hidrocarbonetos aromáticos benzeno, tolueno e isômeros do xileno, componentes da gasolina comercial brasileira.

Deste modo, para comprovar a degradação desta fração por isolados que apresentaram promissora produção de biossurfactantes e isolados que cresceram em todos os substratos testados, foi realizada a análise de cromatografia gasosa.

Entre os métodos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies química. Esta técnica tem sido utilizada para a determinação das frações de hidrocarbonetos que são consumidas pelos microrganismos durante o seu crescimento em combustíveis (Olson et al., 1999; Richard & Vogel, 1999; Bento et al, 2005).

#### **4.6.1 Gasolina comercial e gasolina pura**

Os isolados *P. aeruginosa* UFRGS38, UFRGS96, UFRGS97, *P. aeruginosa* UFRGS98, UFRGS101, *P. aeruginosa* UFRGS103 e UFRGS123 reduziram as medidas de tensão do meio de cultura para valores inferiores a 40 mN/m, demonstraram alta capacidade emulsificação (41-60%) e obtiveram resultados positivos no teste colorimétrico, portanto, foram escolhidos para esta análise. Na tabela 4, estão apresentados os resultados em porcentagem para a degradação do etanol, benzeno, tolueno e xilenos, presentes na gasolina comercial, em meio mineral, após 72 horas de crescimento.

Os isolados UFRGS128 e UFRGS95 foram selecionados para testes de degradação, apesar de não terem apresentado ótimos resultados de emulsificação, entretanto reduziram as medidas de tensão do meio (<40 mN/m) e foram positivos para o teste colorimétrico. Estes isolados foram capazes de crescer em diferentes



fontes de carbono, como gasolina com e sem a adição de álcool e o isolado UFRGS128 em especial também se desenvolveu na mistura de BTX e em tolueno P.A.

Os resultados desta análise mostraram que os microrganismos, que foram considerados bons produtores de biossurfactantes, degradaram preferencialmente o etanol. De acordo com a Tabela 4, a degradação do etanol variou entre 27 e 91 % e os outros valores de degradação, não tiveram diferença estatística em relação aos controles, portanto foi considerado que não houve degradação, da fração monitorada. Segundo a literatura os microrganismos podem utilizar o etanol, como fonte de carbono, para a produção de biossurfactantes. Osman et al. (1996) obtiveram ótima produção de ramnolípido, adicionando 3% de etanol ao meio de cultura com sais minerais, o biossurfactante sintetizado pela cepa *Pseudomonas* BOP100, apresentou um rendimento de 3 g/L.

A degradação preferencialmente do etanol em relação aos compostos BTX, pode estar relacionada ao fato de este ser um composto com estrutura simples e por isso facilmente degradado pelas enzimas constitutivas, que são aquelas que participam em vias metabólicas centrais, ou seja, são sempre produzidas, independente das condições ambientais (Rice, 2000). Enquanto que a degradação dos BTX requer a atividade de enzimas específicas, que necessitam de tempo para serem sintetizadas, pelos organismos (Deeb et al., 2002).

A falta de degradação da fração BTX, pode ser explicada porque estes isolados não possuem competência enzimática, para a degradação destes hidrocarbonetos. Conseqüentemente estes microrganismos degradaram o etanol e

provavelmente outras frações da gasolina comercial, que não foram estudadas neste trabalho. Outra possibilidade, seria a limitação de oxigênio, nos frascos de cultura.

Estudos sobre degradação microbiana revelaram que a presença de 25 mg/L de etanol, inibem a degradação dos hidrocarbonetos BTX, mesmo em condições favoráveis de oxigênio e nutrientes (Deeb et al., 2002). Segundo Shim et al., (2002) a completa degradação aeróbica dos BTX a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  requer aproximadamente 3 mg de oxigênio para cada 1 mg de cada composto BTEX, a ser degradado. Em condições ambientais, a água contém 8-12 mg/L de oxigênio dissolvido, o que é suficiente para a biodegradação de apenas 3-4 mg/L de um composto BTEX.

Portanto, podemos sugerir que em um primeiro momento os microrganismos degradaram o etanol, utilizando enzimas constitutivas. Nesta etapa da degradação, provavelmente foram consumidas as fontes de nutrientes e principalmente os aceptores de elétrons, no caso o oxigênio, presentes nos frascos de cultura, que são hermeticamente fechados. Conseqüentemente pode não ter ocorrido condições para a degradação dos compostos aromáticos, mesmo que estes isolados apresentem potencial enzimático para metabolizar estes hidrocarbonetos.

A falta de degradação de compostos mais recalcitrantes, em decorrência da presença de fontes de carbono de fácil assimilação, já foi estudada por outros autores. Silva & Alvarez (2002) avaliaram a influência, do etanol e do metil t-butil éter (MTBE), na degradação dos compostos BTXE. Foram realizados experimentos em colunas contendo água subterrânea e analisada a degradação por atenuação natural dos hidrocarbonetos, em cromatógrafo gasoso. O MTBE não influenciou a

degradação dos compostos aromáticos, no entanto houve degradação preferencial do etanol. O etanol foi rapidamente degradado e exigiu uma alta demanda de nutrientes e aceptores de elétrons, impedindo a degradação da fração BTXE.

Durante estudo da degradação preferencial aeróbica do benzeno na ausência e presença do etanol, por uma cultura pura (RR1), Deeb et al., (2002) observaram que quando o etanol foi inserido no experimento junto com o benzeno, a degradação do benzeno foi muito lenta, até a exaustão do etanol. Experimentos semelhantes avaliando o impacto do etanol na degradação do tolueno, etilbenzeno e xilenos, mostraram resultados similares.

**Tabela 4.** Degradação em percentual da gasolina comercial pelos isolados produtores de biossurfactantes (*P. aeruginosa* UFRGS38, UFRGS95, UFRGS96, UFRGS97, UFRGS98, UFRGS101, UFRGS103, UFRGS123 e UFRGS128) em meio mineral durante 72 horas.

Microrganismo	Gasolina Comercial (%)					
	Etanol	Benzeno	Tolueno	Xilenos		
				<i>m</i> -xileno	<i>p</i> -xileno	<i>o</i> -xileno
<i>P. aeruginosa</i> UFRGS38	27 <sup>a</sup>	6 <sup>b</sup>	0	0	2 <sup>b</sup>	0
UFRGS95	52 <sup>a</sup>	13 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	0	6 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>
UFRGS96	37 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup>	0	0	0	0
UFRGS97	66 <sup>a</sup>	8 <sup>b</sup>	0	0	1 <sup>b</sup>	0
<i>P. aeruginosa</i> UFRGS98	38 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	0	0	0	0
UFRGS101	50 <sup>a</sup>	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> UFRGS103	46 <sup>a</sup>	13 <sup>b</sup>	7 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>
UFRGS123	91 <sup>a</sup>	14 <sup>b</sup>	0	0	0	0
UFRGS128	59 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	0	5 <sup>b</sup>	0	0

(a) com diferença significativa (b) sem diferença significativa

Para avaliar a influência do etanol na degradação da fração BTX presente na gasolina, foi analisada a degradação da gasolina sem adição de etanol, pelos isolados produtores de biossurfactantes: UFRGS38, UFRGS95 e UFRGS128, que de acordo com testes anteriores (Tabela 1), foram capazes de crescer em gasolina sem etanol. No entanto, não foi observada degradação da fração BTX, para os isolados produtores de biossurfactantes, sugerindo que estas bactérias utilizaram outra fonte de carbono presente na gasolina pura para o seu crescimento, que não foi monitorado em nosso trabalho.

Foram escolhidos os isolados *B. vietnamiensis* UFRGS62, UFRGS63 e *B. vietnamiensis* UFRGS68, devido a sua capacidade de se desenvolver em todos os substratos testados (Tabela 1). São mostrados na Tabela 5 os resultados da análise de degradação do etanol, presente apenas na gasolina comercial e da fração BTX para gasolina pura e comercial, para estes isolados.

O isolado *B. vietnamiensis* UFRGS62, exibiu valores próximos de degradação tanto para a gasolina pura como para a comercial. Foi degradado 30% do isômero m-xileno, em gasolina comercial e 42% em gasolina pura. O isolado *B. vietnamiensis* UFRGS68 também apresentou resultados semelhantes de degradação nos diferentes substratos testados, degradou 50% do tolueno, em gasolina comercial e 38% em gasolina pura. Os outros valores não foram estatisticamente diferentes dos controles.

O isolado UFRGS63 crescendo em gasolina comercial, degradou 54% do m-xileno e 25% do etanol e tolueno, entretanto quando este isolado foi cultivado em gasolina pura, exibiu outro perfil de degradação, pois foi capaz de degradar apenas

o isômero m-xileno (43%). Este foi o único isolado que apresentou um perfil diferente de degradação nas duas fontes de carbono. Como o isolado UFRGS63 foi o único a degradar o etanol, hidrocarboneto facilmente assimilável, a presença deste composto pode ter promovido um crescimento mais rápido desta cultura, resultando em um maior número de microrganismos. Esta população então, obteve biomassa com potencial enzimático, suficiente, para degradar o tolueno e maiores quantidades de m-xileno, presentes na gasolina comercial.

De acordo com Alvarez & Hunt (2002) o etanol presente na gasolina representa uma fonte de carbono facilmente assimilável. Este hidrocarboneto pode estimular o crescimento de uma variedade de microrganismos aeróbios e anaeróbios em uma população, incluindo degradadores de BTXE. Em condições competitivas por fontes de carbono limitadas, uma concentração maior de degradadores de BTXE poderia então, conduzir uma rápida taxa de degradação destes compostos.

Concordando com os dados obtidos neste trabalho, outros estudos reportaram que: o tolueno (Gulensoy & Alvarez, 1999; Shim et al., 2002; Lapertot et al., 2007) e o m-xileno (Ridgway et al., 1990; Solano-Serena et al., 2000) foram os mais freqüentemente degradados, quando comparados aos outros compostos aromáticos; os isômeros p-xileno e o-xileno são considerados mais recalcitrantes (Oldenhuis et al., 1989; Alvarez & Vogel, 1991; Oh et al., 1994; Yu et al., 2001; Botton & Parsons, 2007); o benzeno, não foi degradado pelos isolados, provavelmente porque este hidrocarboneto é considerado, entre os BTXE, o composto mais tóxico (Gulensoy & Alvarez, 1999; Solano-Serena et al., 2000; Shim

et al., 2002; Otenio et al., 2005).

**Tabela 5.** Degradação em percentual da gasolina comercial e gasolina pura pelos isolados *B. vietnamiensis* UFRGS62, UFRGS63 e *B. vietnamiensis* UFRGS68 em meio mineral durante 72 horas.

Microrganismo	Gasolina Comercial e Gasolina Pura (%)					
	Etanol	Benzeno	Tolueno	Xilenos		
				<i>m</i> -xileno	<i>p</i> -xileno	<i>o</i> -xileno
<i>B. vietnamiensis</i> UFRGS62	8 <sup>b</sup>	6 <sup>b</sup> (0)	11 <sup>b</sup> (0)	30 <sup>a</sup> (42 <sup>a</sup> )	0 (0)	0 (0)
UFRGS63	25 <sup>a</sup>	19 <sup>b</sup> (0)	25 <sup>a</sup> (1 <sup>b</sup> )	54 <sup>a</sup> (43 <sup>a</sup> )	8 <sup>b</sup> (0)	9 <sup>b</sup> (0)
<i>B. vietnamiensis</i> UFRGS68	15 <sup>b</sup>	21 <sup>b</sup> (7 <sup>b</sup> )	50 <sup>a</sup> (38 <sup>a</sup> )	19 <sup>b</sup> (8 <sup>b</sup> )	0 (0)	0 (0)

(a) com diferença significativa (b) sem diferença significativa

Os resultados entre parênteses expressão dados obtidos para gasolina pura

Neste trabalho o etanol presente na gasolina comercial, não prejudicou a degradação dos hidrocarbonetos aromáticos BTX, pelos isolados *B. vietnamiensis* UFRGS62, UFRGS63, *B. vietnamiensis* UFRGS68. Já foi observado que a presença de fontes de carbono de fácil degradação, misturadas a compostos mais recalcitrantes no meio de cultura, não comprometeram a degradação das mesmas. A presença de metil t-butil éter (MTBE), conforme descrito por Eweis et al. (2004) não provocou influência negativa na degradação do benzeno e tolueno. Os hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, no mesmo meio de cultura, não prejudicaram a degradação simultânea destas fontes de carbono (Cunha & Leite, 2000). No entanto, algumas misturas e determinados compostos, podem interferir no potencial e perfil de degradação de alguns hidrocarbonetos (Olson et al, 1999; Yu et al., 2001; Reardon et al, 2002; Otenio et al., 2005).

#### 4.6.2 BTX (P.A)

A gasolina possui mais de 200 compostos em sua composição, portanto várias interações podem ocorrer entre estas substâncias, que prejudicam o real potencial de degradação dos hidrocarbonetos BTX, pelos isolados. Portanto, para analisar a capacidade de degradação desta fração pura, foram realizados experimentos de degradação de benzeno, tolueno e xilenos (P.A), que foram inoculados juntos no mesmo frasco hermeticamente fechados, com os microrganismos *B. vietnamiensis* UFRGS62, UFRGS63 e *B. vietnamiensis* UFRGS68.

Os isolados degradaram os isômeros *p*- e *o*-xilenos (Tabela 6). O percentual de degradação foi igual para os dois isômeros e similar para as três bactérias: 22% para o isolado *B. vietnamiensis* UFRGS62, 25% para o isolado UFRGS63 e 23% para o isolado *B. vietnamiensis* UFRGS68.

Ao contrário do experimento com gasolina comercial e gasolina pura, onde os compostos aromáticos mais degradados foram o tolueno e o *m*-xileno, no experimento de degradação de BTX (P.A) juntos, estes hidrocarbonetos não foram degradados.

**Tabela 6.** Degradação em percentual dos hidrocarbonetos benzeno, tolueno e xilenos P.A (30 mg L<sup>-1</sup>) inoculados juntos pelos isolados *B. vietnamiensis* UFRGS62, UFRGS63 e *B. vietnamiensis* UFRGS68 em meio mineral durante 72 horas.

Microrganismo	BTX (P.A) juntos (%)				
	Benzeno	Tolueno	Xilenos		
			<i>m</i> -xileno	<i>p</i> -xileno	<i>o</i> -xileno
<i>B. vietnamiensis</i> UFRGS62	15 <sup>b</sup>	15 <sup>b</sup>	15 <sup>b</sup>	22 <sup>a</sup>	22 <sup>a</sup>
UFRGS63	16 <sup>b</sup>	17 <sup>b</sup>	19 <sup>b</sup>	25 <sup>a</sup>	25 <sup>a</sup>
<i>B. vietnamiensis</i> UFRGS68	17 <sup>b</sup>	16 <sup>b</sup>	17 <sup>b</sup>	23 <sup>a</sup>	23 <sup>a</sup>

(a)com diferença significativa (b) sem diferença significativa

A toxicidade dos BTX misturados na mesma amostra pode ser maior do que separadamente e o processo de degradação pode ser, tanto inibido como estimulado, por esta mistura (Alvarez & Vogel, 1991; Reardon et al, 2002; Otenio et al., 2005). Portanto, foi analisada a degradação dos BTX individualmente pelo isolado *B. vietnamiensis* UFRGS62.

Os resultados desta análise diferiram, em relação a porcentagem de degradação e hidrocarboneto degradado, dos resultados obtidos quando testada a degradação dos BTX no mesmo frasco. De acordo com a Tabela 7, o isolado *B. vietnamiensis* UFRGS62, degradou em 54% o benzeno e 87% o tolueno, entretanto não degradou os isômeros do xileno.



**Tabela 7.** Degradação em percentual dos hidrocarbonetos benzeno, tolueno e xilenos (50 mg L<sup>-1</sup>) inoculados individualmente pelo isolado *B. vietnamiensis* UFRGS62, em meio mineral durante 72 horas.

Microrganismo	BTX separados (%)				
	Benzeno	Tolueno	Xilenos		
			<i>m</i> -xileno	<i>p</i> -xileno	<i>o</i> -xileno
<i>B. vietnamiensis</i> UFRGS62	54 <sup>a</sup>	87 <sup>a</sup>	12 <sup>b</sup>	14 <sup>b</sup>	13 <sup>b</sup>

(a) com diferença significativa (b) sem diferença significativa

Relacionando os resultados para o isolado *B. vietnamiensis* UFRGS62, observou-se que quando os três hidrocarbonetos (BTX) foram colocados no mesmo frasco apenas os *p*- e *o*-xilenos foram degradados, no entanto na cultura individual apenas o benzeno e o tolueno foram degradados (Tabela 6 e 7).

O diferente perfil de degradação nas duas análises, pode ser explicado em decorrência à toxicidade dos xilenos. O isolado *B. vietnamiensis* UFRGS62 é capaz de degradar xileno, como foi observado no experimento da tabela 6 (BTX misturados). Entretanto a concentração usada no experimento individual (50 mg/L) em relação a mistura (90 mg/L), pode ter sido tóxica para as células, conseqüentemente não havendo degradação deste hidrocarboneto.

Solano-Serena et al. (2000) estudaram a capacidade de crescimento de microrganismos, em misturas de componentes da gasolina, utilizando ensaios respirométricos e análises cromatográficas. Foi observado que o *o*-xileno, foi degradado apenas quando misturado a outros hidrocarbonetos, sugerindo que a concentração do teste individual (350 mg/L, comparada a 20 mg/L na mistura) foi tóxica as células bacterianas.

A degradação dos xilenos na mistura e a não degradação no experimento

BTX separado, também pode ser justificada pela interação entre substratos. Quando os três hidrocarbonetos foram inoculados misturados, o benzeno e/ou o tolueno podem ter estimulado a degradação dos isômeros *p*- e *o*- xilenos, sugerindo uma interação entre estes hidrocarbonetos durante a sua degradação (Alvarez & Vogel, 1991). No entanto, no presente trabalho deve ser considerado, que não ocorreu degradação do benzeno e tolueno.

Alvarez & Vogel, (1991) estudaram as interações entre substratos dos compostos BTX e observaram que a adição de tolueno a cultura, estimulava a degradação do benzeno pela cepa de *Pseudomonas* CFS-215. Mesmo a presença em baixas concentrações do tolueno (0,1 e 1 mg/L) estimulou a degradação deste hidrocarboneto. Assim sendo o tolueno mesmo em baixas quantidades, foi o suficiente para induzir a expressão das enzimas que degradam estes hidrocarbonetos.

No presente trabalho quando os BTX foram inoculados juntos, o benzeno e/ou o tolueno, podem ter induzido a produção de enzimas degradadoras dos compostos aromáticos, levando a degradação dos xilenos. O tolueno e/ou benzeno podem ter sido degradados, em quantidades muito pequenas, que não foram detectadas nesta metodologia, no entanto foram capazes de estimular a produção de enzimas. Quando os xilenos foram inoculados separadamente não houve degradação, provavelmente pela falta de indução desta enzimas.

O fato dos microrganismos não terem degradado o tolueno e o benzeno, mas degradado o xileno, no experimento BTX misturados (Tabela 7), pode ser justificado porque os três ou os dois substratos, estavam competindo pelo sítio ativo

da mesma enzima. No entanto só podemos utilizar esta justificativa, se os três substratos estivessem sendo inicialmente degradados, pela mesma enzima. A inibição da degradação do benzeno e tolueno pela presença do isômero *p*-xileno, já foi observada por outros autores (Alvarez & Vogel, 1991; Charng et al., 1993; Yu et al., 2001).

A inibição competitiva pelo mesmo sítio enzimático, foi observada na cepa *P. putida* F1, que inicia a oxidação dos poluentes benzeno, tolueno, fenol e outros hidrocarbonetos aromáticos, utilizando a enzima tolueno dioxigenase (TDO). Foi observado que a presença do tolueno e do fenol no mesmo meio de cultura, retardava a degradação do fenol, o mesmo foi observado quando adicionado benzeno e fenol no mesmo meio de cultura. No entanto em culturas contendo benzeno e tolueno juntos não foi observada interferência, sendo os hidrocarbonetos degradados simultaneamente (Reardon et al, 2002).

Nas análises cromatográficas da gasolina comercial e gasolina pura, não foi observada degradação dos isômeros *p*- e *o*- xilenos, esta degradação só ocorreu quando testada a fração BTX (P.A) misturada. Este resultado concorda com a hipótese de interações entre substratos. De acordo com a literatura já foram observadas reações de interação de substrato entre *o*-xileno e benzeno (Gulensoy & Alvarez, 1999) e *p*-xileno com tolueno e benzeno (Alvarez & Vogel, 1991).

Entretanto, tanto na gasolina comercial como na gasolina pura estão presentes frações de benzeno e tolueno, porém em quantidades menores do que nos testes onde foi utilizado BTX P.A. A mistura de mais de 200 compostos presentes na gasolina e a menor concentração destes hidrocarbonetos aromáticos,

podem ter interferido nestas interações entre xilenos, benzeno e tolueno.

#### **4.6.3 Degradação com adição de extrato de levedura e de glicose**

Com o intuito de aumentar a degradação da gasolina comercial, principalmente da fração BTX, foram adicionados ao meio mineral glicose e extrato de levedura, nas concentrações 0,2% e 0,1% respectivamente. A glicose é uma fonte de carbono de fácil assimilação e o extrato de levedura, oferece suporte ao metabolismo celular e é fonte adicional de vitaminas, aminoácidos e nitrogênio. A análise da degradação foi realizada em cromatógrafo gasoso, após 72 horas de incubação, a 30 °C.

O isolado *P. aeruginosa* UFRGS38, em nosso estudo, apresentou ótima capacidade de produção de biossurfactantes. Nas análises cromatográficas de degradação da gasolina comercial, este isolado, degradou de 27% do etanol e não degradou os hidrocarbonetos aromáticos BTX. O isolado *B. vietnamiensis* UFRGS62, de acordo com os testes de degradação apresentados neste trabalho, foi capaz de degradar a fração BTX, não degradou o etanol e não produziu biossurfactantes. Portanto, o critério utilizado para a escolha dos isolados nesta análise foi: um microrganismos capaz de degradar BTX e um isolado produtor de surfactantes que não degradou a fração BTX, nas condições testadas.

A adição de extrato de levedura, ao meio de cultura, não estimulou a degradação da fração de interesse da gasolina comercial, nas condições testadas pelos isolados *B. vietnamiensis* UFRGS62 e *P. aeruginosa* UFRGS38. No entanto a adição de glicose provocou um aumento significativo na degradação do etanol e da

fração BTX pelo isolado *B. vietnamiensis* UFRGS62. Em relação ao teste de degradação da gasolina comum (Tabela 5) este isolado degradou apenas o hidrocarboneto *m*-xileno (30%), houve estímulo na degradação de todos os hidrocarbonetos analisados. O isolado *B. vietnamiensis* UFRGS62 degradou: 51% do etanol, 50% do benzeno, 48% do tolueno, 36% do *m*-xileno (resultado semelhante ao teste anterior) 30% do *p*-xileno e 48% do *o*-xileno (Tabela 8).

Substratos facilmente assimiláveis, como a glicose, podem aumentar o crescimento de uma cultura, oferecendo condições energéticas para a produção de uma maior biomassa, conseqüentemente estimulando a degradação de hidrocarbonetos mais recalcitrantes (Alvarez & Vogel, 1991).

Substratos facilmente assimiláveis, como a glicose, podem aumentar o crescimento de uma cultura, oferecendo condições energéticas para a produção de maior biomassa, conseqüentemente estimulando a degradação de hidrocarbonetos mais recalcitrantes (Alvarez & Vogel, 1991). Desta forma, outros autores adicionaram glicose ao meio de cultura e obtiveram resultados satisfatórios de degradação. Lee et al., (2007) observaram que a glicose estimulou a degradação do tolueno, por uma cultura de *P. putida*. Yadav & Reddy, (1993) utilizaram meio de cultura suplementado com 1% de glicose, para a análise da degradação dos hidrocarbonetos BTXE, por cepas de Basidiomycetes. Sabaté et al. (2004) estudaram a degradação dos hidrocarbonetos totais (TPH) presentes em um solo contaminado, obtiveram melhores resultados no tratamento utilizando meio mineral, suplementado com 0,2% de glicose. Shim et al., (2002) adicionaram 1% de glicose ao ensaio, para estimular a degradação do benzeno, onde os dois substratos foram

degradados simultaneamente, no entanto, não foi observado aumento na degradação do benzeno, quando comparado ao resultado obtido sem a adição de glicose no meio de cultura.

Em contra partida, os microrganismos podem consumir a glicose e não degradar os compostos mais recalcitrantes presentes no meio de cultura. O isolado *P. aeruginosa* UFRGS38, não degradou a fração BTX, o que concorda com o teste anterior de degradação da gasolina comercial. Entretanto neste experimento, não foi observada degradação do etanol, sugerindo que este isolado utilizou a glicose como fonte de carbono para o seu desenvolvimento.

**Tabela 8.** Degradação em percentual da gasolina comercial pelos isolados *P. aeruginosa* UFRGS38 e *B. vietnamiensis* UFRGS62 em meio mineral suplementado com glicose (0,2%), durante 72 horas.

Microrganismo	Gasolina Comercial + Glicose (0,2%) (%)					
	Etanol	Benzeno	Tolueno	Xilenos		
				<i>m</i> -xileno	<i>p</i> -xileno	<i>o</i> -xileno
<i>P. aeruginosa</i> UFRGS38	15 <sup>b</sup>	7 <sup>b</sup>	0	0	0	0
<i>B. vietnamiensis</i> UFRGS62	51 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>	48 <sup>a</sup>	36 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	48 <sup>a</sup>

(a) com diferença significativa (b) sem diferença significativa

#### 4.7 Produção de biossurfactantes

Para a produção de biossurfactantes os microrganismos podem utilizar fontes de carbono solúveis em água, como a glicose e/ou insolúveis, como óleos e alguns combustíveis. Portanto, foram testados 4 diferentes meios de cultura (Apêndices 8.1.6, 8.1.7 e 8.1.8), na tentativa de otimizar a produção dos biossurfactantes, produzidos pelos isolados *P. aeruginosa* UFRGS38, UFRGS95, UFRGS97, *P. aeruginosa* UFRGS98, UFRGS98, *P. aeruginosa* UFRGS103 e

UFRGS123.

A partir deste experimento foram definidos os dois melhores meios de cultura para a produção de biossurfactantes, utilizando como critério as medidas de redução de tensão superficial e capacidade de emulsificação. O isolado UFRGS38 que se destacou dos demais quanto a produção de surfactantes, foi escolhido para a próxima etapa do trabalho.

Utilizando os dois melhores meios de cultura (PPGAS e MSM + 2% Glicose), foram realizadas curvas de crescimento, relacionando com a produção de biossurfactantes. O crescimento celular foi acompanhado por medidas de densidade óptica e a produção do surfactante, foi analisada através de medidas de redução de tensão superficial do meio de cultura e pelo índice de emulsificação.

Após o crescimento do isolado *P. aeruginosa* UFRGS38, nos meios PPGAS e MSM + 2% Glicose, o ramnolipídeo foi extraído, por precipitação ácida. Posteriormente, o biossurfactante produzido foi quantificado, de acordo com o conteúdo de ramnose presente no extrato.

#### **4.7.1 Teste com diferentes meios para produção de ramnolipídeos**

Os biossurfactantes são sintetizados por bactérias, leveduras e fungos filamentosos durante seu crescimento, favorecendo assim a sua cinética de crescimento. Podem ser produzidos a partir de diferentes fontes de carbono desde substâncias hidrófilas como a glicose, até substratos hidrófobos como os hidrocarbonetos (Koch et al., 1991; Perfumo et al., 2006).

Os isolados *P. aeruginosa* UFRGS38, UFRGS95, UFRGS97, *P.*

*aeruginosa* UFRGS98, *P. aeruginosa* UFRGS103 e UFRGS123 obtiveram resultados satisfatórios nos testes de capacidade de produção de biossurfactantes, portanto, estes isolados foram cultivados em outras fontes de carbono, com objetivo de analisar sua competência de produção na ausência de um substrato hidrofóbico, nos meios MSM + 2% Glicose e PPGAS (0,05% glicose) e em diferentes fontes hidrofóbicas de carbono (óleo de soja e diesel) (Tabela 9).

A produção do biossurfactantes foi avaliada pela medida de tensão superficial e emulsificação após 5 dias de cultivo. A medida de tensão superficial inicial para cada meio era de: 55,6 mN/m, 48,6 mN/m, 49,4 mN/m e 50 mN/m para os meios MSM + 2% Glicose, PPGAS, meio mineral mais 1% de óleo de soja e de diesel, respectivamente.

No início do experimento (tempo 0 hora) o meio PPGAS e os meios minerais com a adição de óleo de soja e diesel, provocaram redução nas medidas de tensão superficial. Este fato é explicado pela presença de peptona (PPGAS) e óleo na superfície do meio de cultura que, segundo a literatura, provocam redução nesta medida (Miller & Zhang, 1997). Além disso, o valor medido da tensão superficial da água utilizada para a confecção dos meios de cultura, utilizados neste trabalho, foi em média 65,8 mN/m.

Nos testes de emulsificação, utilizando os sobrenadantes das culturas provenientes do crescimento microbiano em: MSM + 2% Glicose, PPGAS e meio mineral acrescido de 1% de óleo diesel, foi empregado óleo diesel para o teste de índice de emulsificação. Nas culturas utilizando meio mineral acrescido de 1% óleo de soja, o índice de emulsificação foi realizado com óleo de soja.



O meio MSM + 2% Glicose apresentou os melhores resultados em relação a redução das medidas de tensão superficial, estes valores variaram entre 27,7 a 31,2 mN/m. Os valores das medidas de tensão superficial obtidos pelas bactérias UFRGS97 (29,3 mN/m) e *P. aeruginosa* UFRGS98 (27,7 mN/m) foram significativamente diferentes das medidas obtidas para os demais isolados testados.

Quanto aos valores de emulsificação, neste mesmo meio de cultura, os isolados *P. aeruginosa* UFRGS38, UFRGS95, UFRGS97 e *P. aeruginosa* UFRGS103 apresentaram valores entre 41-60%. O isolado UFRGS123 obteve uma emulsificação entre 21 a 40% e o isolado *P. aeruginosa* UFRGS98, apesar de ter mostrado ótimo resultado na medida de redução de tensão superficial do meio, emulsificou fracamente o óleo diesel (5-20%).

De acordo com o crescimento dos isolados no meio PPGAS, as medidas de redução de tensão variaram entre 34,2 e 41,2 mN/m. O único isolado que não apresentou redução na medida de tensão superficial significativa foi o isolado *P. aeruginosa* UFRGS98 (41,2 mN/m). Os resultados obtidos para os outros isolados não apresentaram diferença estatística. Todos os microrganismos demonstraram alta capacidade de emulsificação (41-60%) do óleo diesel, após crescimento em meio PPGAS, com exceção do isolado *P. aeruginosa* UFRGS98, que não obteve nenhuma emulsificação.

Os resultados obtidos, nas medidas de tensão superficial e emulsificação, para os meios com adição de óleo de soja e diesel como única fonte de carbono, foram inferiores aos demais. Quando se utilizou óleo de soja como fonte de carbono, as medidas de tensão variaram entre 35,9 e 48,7 mN/m, neste caso a cepa *P.*

*aeruginosa* UFRGS103 se destacou com o menor valor de redução de tensão (35,9mN/m). As medidas de redução de tensão para o experimento com óleo diesel, variaram entre 38,4 e 48,1 mN/m, sendo que o isolado UFRGS97 apresentou o menor valor (38,4 mN/m). O isolado *P. aeruginosa* UFRGS38, obteve pequena emulsificação (5-20%) em óleo de soja e diesel, assim como o isolado UFRGS97 em óleo diesel.

O meio PPGAS possui fontes de nitrogênio orgânico em sua composição, tais como a proteose peptona e a amônia. Estes nutrientes, segundo Mulligan & Gibbs, (1989) proporcionam alta produção de ramnolipídeos. A baixa concentração de fosfato, no meio PPGAS também, pode favorecer a produção de biossurfactantes (Guerra-Santos et al., 1984; Mulligan et al., 1989).

De acordo com a literatura, meios de cultura contendo fosfato também podem ser usados para a produção de biossurfactante, porque possuem ação tamponante, facilitando o crescimento microbiano (Reiling et al., 1986; Nischer et al., 2006). O meio de cultura MSM + 2% Glicose, que no presente trabalho, obteve bons resultados para produção de biossurfactantes, sendo constituído de sais minerais, glicose e 1% de ácido fosfórico (85%) (Bodour et al., 2003).

De acordo com Desai e Banat (1997) os pesquisadores possuem opiniões divergentes quanto a melhor fonte de nitrogênio para a produção de biossurfactantes, assim como, a concentração ideal de nitrogênio no meio de cultura. Nischer et al. (2006) cultivaram microrganismos em meio limitado em nitrogênio e observaram diminuição na produção de biossurfactantes, entretanto Wei et al. (2005), relataram que o meio de cultura Lúria Bertani (LB), muito utilizado no

cultivo de espécies de *Pseudomonas sp*, tem muito nitrogênio, por isso diminuiu a produção de ramnolipídeos. Ochsner et al. (1995) obtiveram ótima produção de biossurfactante em meio com baixa concentração de nitrogênio.

Da mesma forma, não há um consenso, quanto a adição de ferro no meio de cultura para produção de biossurfactantes. Jacques et al. (2008), estudando a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas citronellolis*, relatou que a adição de Fe-Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> ao meio de cultura, reduziu a medida de tensão do meio para 26 mN/m, enquanto que na ausência de ferro esta medida era de 36,2 mN/m. Entretanto, Guerra-Santos et al., (1984) observaram que o excesso de ferro no meio de cultura reduziu a produção de biomassa e ramnolipídeos, por outro lado a ausência de ferro também prejudicou a produção do biossurfactante.

Os melhores resultados obtidos para os meios MSM + 2% Glicose e PPGAS, podem ser justificados pela composição dos meios de cultura, que são apropriadas para a produção de biossurfactantes. Estes meios de cultura tem como fonte de carbono a glicose, que é facilmente assimilável pelos microrganismos. Já os meios de cultura contendo óleo de soja e óleo diesel, possuem fonte de carbono, mas que não estão prontamente disponível, portanto os cinco dias de experimento podem não ter sido suficientes para se obter um bom crescimento, nestes substratos.

**Tabela 9.** Produção de biossurfactantes pelos isolados *P. aeruginosa* UFRGS38, UFRGS95, UFRGS97, *P. aeruginosa* UFRGS98, *P. aeruginosa* UFRGS103 e UFRGS123 em meio MSM + 2% Glicose, PPGAS, meio mineral com 1% de óleo de soja e 1% de diesel, durante 5 dias.

Diferentes meios para produção de biossurfactantes												
Isolado	MSM + 2% Glicose			PPGAS			Óleo de Soja		Óleo Diesel			
	TS (mN/m)	E		TS (mN/m)	E		TS (mN/m)	E	TS (mN/m)	E		
UFRGS38	30,5	±0,14	+++	35,1	±0,21	+++	38,9	±0,28	+	40,6	±0,57	+
UFRGS95	29,8	±0,57	+++	36	±1,34	+++	38	±0,57	-	41,4	±0,28	-
UFRGS97	29,3	±0,49	+++	34,2	±0,92	+++	37,7	±0,42	-	38,4	±0,78	+
UFRGS98	27,7	±0,78	+	41,2	±1,90	-	48,7	±1,06	-	48,1	±1,27	-
UFRGS103	30,2	±0	+++	36,2	±1,06	+++	35,9	±0,35	-	42,8	±0,78	-
UFRGS123	31,2	±0,35	++	35,2	±0,85	+++	37,7	±0,92	-	42,1	±1,27	-

Os sinais de positivo indicam a intensidade da emulsificação: (-) sem emulsificação; (+) emulsificação entre 5-20%; (++) emulsificação entre 21-40%; (+++) emulsificação entre 41-60%. TS = Tensão superficial e E= Emulsificação.

Zhang et al., (1992) utilizaram o meio de cultura PPGAS para produção de ramnolípídeos pela cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027. A medida de tensão do meio de cultura começou a diminuir após 6 horas de cultivo, em 48 horas esta medida atingiu 29 mN/m, sendo que em 60 horas o isolado atingiu o maior índice de produção. Com relação aos nossos ensaios utilizando o meio de cultura PPGAS, o isolado *P. aeruginosa* UFRGS98 apresentou redução no valor de tensão superficial de 48,6 para 27,7 mN/m.

Bodour et al. (2003), realizaram uma seleção de microrganismos produtores de biossurfactantes, provenientes de vários tipos de solos e utilizaram o meio de cultura MSM + 2% de glicose, para o cultivo dos microrganismos. Entre os isolados, identificados como produtores de surfactantes, foram identificadas duas cepas de *Pseudomonas* spp., produtoras de ramnolípídeos que reduziram a medida

da tensão do meio de cultura para 28,7 e 27,3 mN/m. Quando este mesmo meio de cultura foi utilizado no presente trabalho, observou-se, uma redução de 48,6 para 34,2 mN/m, como a menor medida de redução de tensão superficial, obtida pelo isolado UFRGS97.

Outros autores utilizaram a glicose como fonte de carbono para produção de biossurfactantes (Javaheri et al., 1985; Tuleva et al., 2002; Gunther et al., 2004; Perfumo et al., 2006). Wei et al. (2005) utilizaram glicose (4%) e meio mineral, para produção de ramnolípideo, obtiveram rendimento de 12 mg/L, entretanto a produção foi ainda maior, quando empregado azeite de oliva (10%) como fonte de carbono, totalizando 26 mg/L de rendimento. Estes autores também utilizou como substrato óleo diesel e glicerol, no entanto os resultados de produção foram muito inferiores.

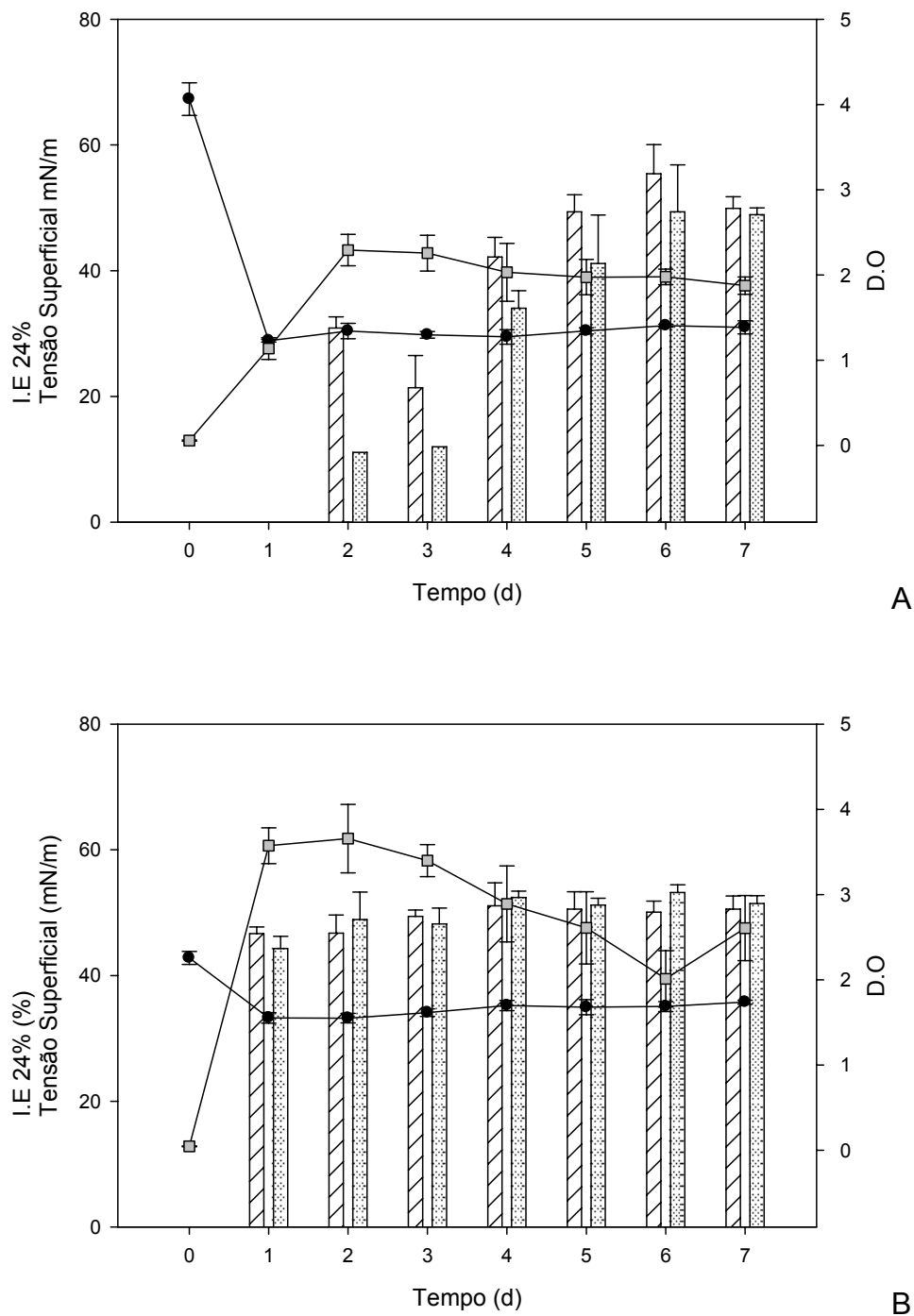
Perfumo et al. (2006), avaliaram a capacidade da cepa *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1 de produzir ramnolípideos utilizando diferentes fontes de carbono. O isolado reduziu a tensão superficial do meio de 70 mN/m (água) para 42 mN/m, consumindo glicose, crescendo em hexadecano, a redução observada foi de 38 mN/m. No entanto, obtiveram melhores resultados quando testaram glicerol e óleo de soja, onde o valor de redução da tensão superficial foi de 28 e 30 mN/m, respectivamente. Ao contrário do presente trabalho onde os isolados obtiveram melhores resultados crescendo em glicose.

A razão pela qual os microrganismos sintetizam biossurfactantes normalmente está relacionada ao aumento da biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos (Mulligan, 2005; Van Hamme et al., 2006). No entanto, nesta etapa do trabalho, as bactérias isoladas mostraram maior produção de biossurfactantes,

crescendo em um substrato hidrofílico, prontamente disponível, a glicose.

Segundo a bibliografia, a produção de biossurfactantes, durante o crescimento microbiano, também podem conferir aos microrganismos outros benefícios. Os biossurfactantes são também importantes para a movimentação celular, facilitando o acesso aos substratos, interações célula-célula, como na comunicação no caso de diferenciação celular (Van Hamme et al., 2006). Além disso, a produção de ramnolipídeos também está ligada a síntese de fatores de virulência (Wagner et al., 2004;) e atividade antimicrobiana (Benincasa et al., 2004).

A partir destes dados os meios MSM + 2% Glicose e PPGAS, que demonstraram melhores condições para produção de biossurfactantes, foram escolhidos para análises de cinética de produção e posterior extração do ramnolipídeos. O isolado *P. aeruginosa* UFRGS38 que obteve bons resultados para produção de ramnolipídeos nos dois meios, foi escolhido para esta análise (Figura 13). Foram realizadas curvas de crescimento, durante sete dias, onde a cada 24 horas foram retiradas alíquotas para medidas de tensão superficial, emulsificação e crescimento celular, determinado por densidade ótica.



**Figura 13.** Tempo de cultivo e detecção de ramnolípideo para o isolados *P. aeruginosa* 38. A curva de produção foi realizada em meio MSM + 2% Glicose (A) e meio PPGAS (B), a 30 °C por 7 dias. Alíquotas foram analisadas a cada 24 horas. Símbolos: (●) Tensão superficial (mN/m); (□) Densidade ótica (600 nm); (barra vertical com listras) emulsificação da cultura com células; (barra vertical cinza) emulsificação com sobrenadante.

Foi observado uma redução significativa nos valores de tensão superficial nos dois meios de cultura avaliados (MSM + 2% Glicose e PPGAS), após 24 horas de incubação. Foi constatado que após 24 horas a redução observada, não diferiu significativamente dos demais tempos avaliados até sete dias. Após 24 horas de crescimento o isolado *P. aeruginosa* UFRGS38 reduziu a tensão do meio de cultura de 67,3 mN/m para 28,8mN/m, quando inoculado no meio MSM + 2% glicose e de 42,8 mN/m para 33,2 mN/m, quando inoculado no meio PPGAS.

O isolado *P. aeruginosa* UFRGS38 iniciou a produção de ramnolipídeos na fase logarítmica de crescimento, antes do ponto 24 horas. Muitos autores concordam que a produção de biossurfactantes inicia na fase logarítmica e continua durante a fase estacionária (Hommel, 1990; Haba et al. 2000; Tuleva et al., 2001). Esta característica parece ser intrínseca à produção de biossurfactantes, para este isolado (*P.aeruginosa* UFRGS38), porque no ensaio utilizando gasolina comum como fonte de carbono (item 4.4), também iniciou a produção na fase logarítmica de crescimento.

Relacionando os dados das medidas de tensão superficial entre os dois meios testados, para cada ponto das curvas de crescimento, observou-se que apenas no segundo dia não houve diferença significativa entre os resultados obtidos. Sendo que, no segundo dia de experimento o valor da medida de tensão superficial para o meio de cultura MSM + 2% de glicose foi de 30,4 mN/m e para o meio PPGAS foi de 33,2 mN/m. Em todos os outros pontos da curva de crescimento, o meio MSM + 2% de glicose obteve valores inferiores para as medidas da tensão superficial, portanto foi concluído que este meio de cultura proporcionou melhores



condições nutricionais para a produção de ramnolipídeos, segundo esta análise.

Com relação a produção de emulsificantes para o isolado *P. aeruginosa* UFRGS38, no ensaio realizado com meio PPGAS, após 24 h de cultivo, foi observado 46% de emulsificação utilizando cultura com células e 44% utilizando o sobrenadante. Nos seguintes dias do experimento a emulsificação com células atingiu o valor máximo de 51 %, no 4º dia e 53 % utilizando o sobrenadante no 6º dia. Entretanto, podemos considerar que houve diferença significativa nas medidas de emulsificação, apenas entre os pontos 0 e 24 horas.

De acordo com os dados de emulsificação obtidos para o isolado *P. aeruginosa* UFRGS38 no meio MSM + 2% glicose, observou-se que em até 48 horas de experimento não houve produção de emulsificantes. A produção de emulsificantes foi observada no segundo dia de experimento, 30 % utilizando meio de cultura com células e apenas 11 % com o sobrenadante. No terceiro dia de ensaio houve uma pequena queda na medida de emulsificação com células (21%) e o valor obtido com o sobrenadante, permaneceu praticamente o mesmo (12%). Após o quarto dia observou-se incremento na produção de emulsificantes 42 % para a cultura com células e 34 % para o sobrenadante.

Quando comparado os resultados de índice de emulsificação para os dois meios de cultura (PPGAS e MSM + 2% glicose), verificou-se que houve diferença significativa nestes valores, até o quinto dia de experimento, após este período as medidas de emulsificação foram estatisticamente similares. Nota-se a partir destes resultados que o meio PPGAS proporcionou uma rápida produção de emulsificantes, em 24 horas foi observado mais de 40% de emulsificação. Entretanto, utilizando o

meio de cultura MSM + 2% Glicose, este valor só foi atingido após cinco dias de cultivo. Portanto podemos concluir que o meio PPGAS, proporcionou melhores condições para a produção de ramnolipídeos, segundo esta análise.

Provavelmente no início da produção de biossurfactantes estas moléculas estavam associados a parede celular. Em decorrência da alta produção de emulsificantes após maior período de incubação, estes surfactantes se dissociaram da parede celular e conseqüentemente, foi observada a presença de emulsificantes no meio de cultura (sobrenadante). Portanto, primeiro foi detectada a emulsificação da cultura com células e em seguida, da cultura sem células (sobrenadante).

Sendo assim, segundo a literatura, existem duas formas de captação de hidrocarbonetos: produção associada à parede celular, onde as superfícies das células ficam mais hidrofóbicas, permitindo maior contato com os compostos hidrofóbicos e facilitando a penetração no espaço periplasmático e/ou produção e excreção, assim levando a solubilização do composto orgânico na fase aquosa, onde a captação ocorre pelo contato direto com as microgotículas dispersas no líquido (Hommel, 1990; Koch et al., 1991; Maier, 2003; Mulligan, 2005).

#### **4.7.2 Extração do ramnolipídeo**

Nesta etapa foi importante obter maiores quantidades de ramnolipídeos, que possibilitem a extração. Segundo Bodour et al. (2003), é interessante produzir biossurfactantes utilizando a glicose como fonte de carbono, para aplicação em áreas de biorremediação, porque é um substrato atóxico apropriada para este propósito. Mas é importante ressaltar que a composição química do biossurfactante

produzido vai depender do meio e fonte de carbono utilizados.

#### 4.7.3 Quantificação do ramnolipídeo

Os ramnolipídeos produzidos foram quantificados pelo método de Dubois et al. (1956), que quantifica os carboidratos totais presentes na amostra. O meio MSM + 2% glicose não foi utilizado para a produção de ramnolipídeos e posterior extração, porque possui alta concentração de glicose em sua composição (2%). Como a metodologia empregada quantifica carboidratos presentes no meio de cultura, para evitar interferências no resultado, devido a possibilidade de detecção de glicose residual, mesmo após incubação, não foi considerada a produção neste meio de cultura.

O isolado *P. aeruginosa* UFRGS38 produziu 5,9 g/L de ramnolipídeos no meio PPGAS. Para confirmar que o carboidrato quantificado era o ramnolipídeo produzido pelo isolado e descartar a possibilidade de detecção de algum açúcar residual presente na amostra, foi realizado o teste de glicemia enzimática, utilizando kit da marca Wiener Lab, que é específico para quantificação de glicose. O resultado foi negativo para presença de glicose.

Youssef et al. (2004) considerou que um bom produtor de biossurfactantes seria capaz de produzir mais de 60 mg/L, deste produto. Haba et al. (2000) obteve produção de 2,7 g/L de ramnolipídeos, pela cepa *P. aeruginosa* 47T2 NCIB 400044, utilizando óleos usados como fonte de carbono. Raza et al. (2007) obtiveram 8,5 g/L, de ramnolipídeos, em um experimento de 12 dias com a *P. aeruginosa* EBN-8, crescendo em meio mineral suplementado com óleo de canola,

sendo que este isolado reduziu a tensão do meio para 29 mN/m e os valores de emulsificação entre 60 a 74%. Rahman et al. (2002) extraíram o ramnolípídeo produzido pela cepa *P. aeruginosa* DS10-129 e obteve 4,31 g/L de produto, utilizando como fonte de carbono o óleo de soja e 2 g/L em glicose, o experimento foi realizado em frascos de 250 mL, onde os substratos eram adicionados ao longo de 288 horas de experimento, este isolado reduziu a tensão do meio para 28 mN/m e emulsificou mais de 70% de todos os hidrocarbonetos testados. Nos três experimentos citados a produção de ramnolípídeo foi calculada de acordo com o conteúdo de ramnose, presente no extrato.

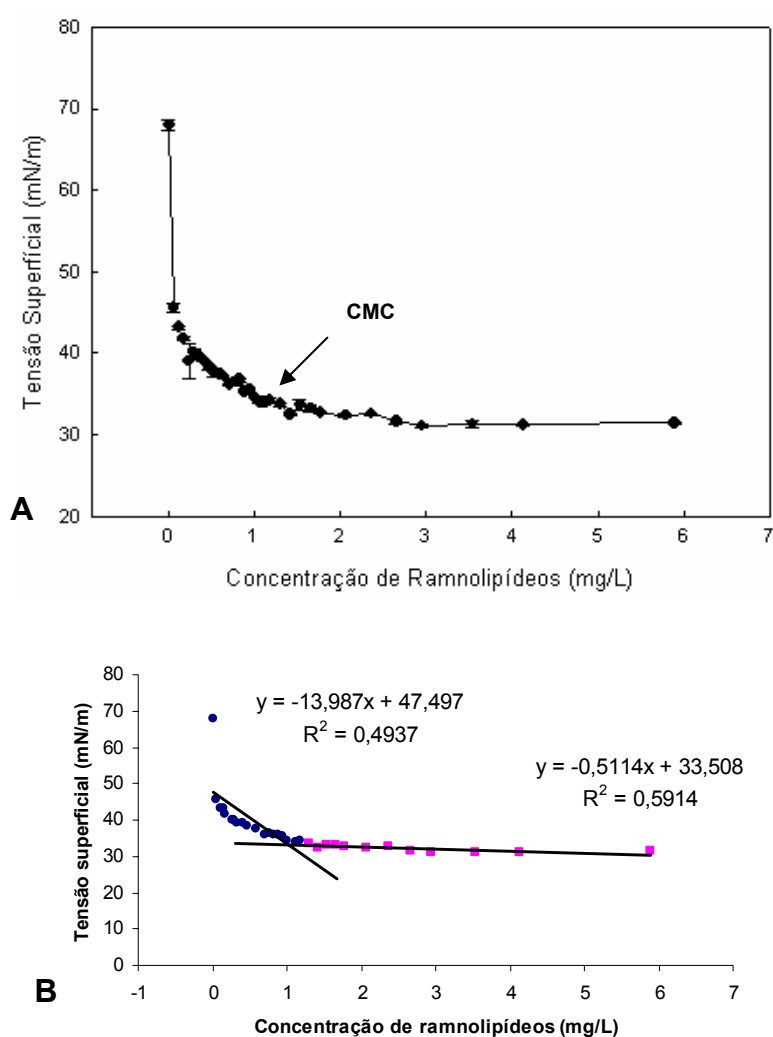
#### **4.7.4 Concentração Micelar Crítica (CMC)**

A medida da tensão superficial de um líquido é reduzida com o aumento da concentração de biossurfactantes adicionados, até atingir um platô definido como concentração micelar crítica (CMC) do surfactante (Mulligan et al., 2005). A CMC do ramnolípídeo produzido pelo isolado *P.aeruginosa* UFRGS38 foi determinada através de diluições sucessivas do extrato, extraído do sobrenadante da cultura, após cultivo em meio de cultura PPGAS. A CMC foi alcançada com 1,1 mg/L do ramnolípídeo (Figura 14).

Segundo Zhang & Miller (1992) os ramnolípídeos se comportam de maneira diferente em solução. Baixas concentrações de ramnolípídeos (< 5 mg/L) possuem forte ação na tensão superficial do meio, no entanto altas concentrações (> 50 mg/L) não possuem efeito significativo.

Na Figura 14, pode-se observar que com a adição de uma pequena

quantidade de biossurfactante (0,06 mg/L) provocou uma queda na tensão superficial do tampão fosfato, de 66,1 para 45,6 mN/m. Após este ponto ocorreu uma redução gradual da tensão até 33,2 mN/m, ao atingir a CMC na concentração de 1,1 mg/L. Após este ponto, mesmo com a adição do dobro desta concentração, não ocorreu diferença no valor da medida de tensão superficial do líquido.



**Figura 14.** Efeito do aumento da concentração de ramnolipídeos na tensão superficial. As soluções de ramnolipídeos foram preparadas em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 (A e B). Gráfico exibindo linhas de tendência (B). A intersecção das linhas de tendência indica o ponto estimado da CMC.

Alguns componentes do meio de cultura, dissolvidos em solução, como alguns solventes, por exemplo, o metanol, podem reduzir a tensão superficial do meio, mesmo na ausência de um surfactante (Miller & Zhang, 1997). A extração do ramnolípido, produzido pela cepa *P. aeruginosa* UFRGS38, foi realizada com os solventes: clorofórmio e etanol. Não foi encontrado na literatura, dados que comprovassem alguma influência destes solventes na redução da tensão superficial. Entretanto, para comprovar o valor de CMC, encontrado no presente trabalho, seria importante a realização de ensaios específicos que fornecessem resultados mais detalhados, quanto a composição do extrato.

Bodour e Miller (1998) determinaram a concentração micelar crítica do surfactante sintético dodecil sulfato de sódio (SDS) e do biossurfactante ramnolípido. Desta maneira, a medida para o ramnolípido, foi de 0 até 27 mg/l e para o SDS foi de 0 até 1845 mg/l.

Fiebig et al. (1997), utilizando *Pseudomonas cepacia* para sintetizar biossurfactantes glicolípidicos, cultivada em óleo de girassol como fonte de carbono, observaram que este isolado atingiu a CMC com 5 mg/L, e o valor de redução de tensão superficial foi de 37 mN/m. A adição de 0,2 g/l deste surfactante, aumentou significativamente a degradação dos contaminantes PCBs. Em outro trabalho, foi verificado que a produção de sofrólípidos por cepas de *Candida* sp em melão de soja, onde a CMC foi atingida em 6 mg/L (Solaiman et al., 2004).

Diferentes composições de ramnolípidos podem levar a diferentes propriedades físico-químicas (Monteiro et al., 2007). Como por exemplo, os di-ramnolípidos geralmente apresentam CMC mais baixa (5 mg/L), devido a presença

de duas moléculas de açúcar, em compensação os mono-ramnolipídeos podem apresentar CMC de até 40 mg/L (Lang & Wullbrandt, 1999).

Mata-Sandoval et al. (1999) analisaram diferentes misturas, na composição de ramnolipídeos, produzidos pela mesma cepa. O isolado reduziu a medida de tensão do meio para 36 mN/m, na CMC de 37 mg/l, no entanto em uma mistura com espécies de cadeias mais curtas, a medida de tensão foi menor (31 mN/m) e a CMC foi mais alta (53 mg/l). Ramnolipídeos que contém cadeias de ácidos graxos maiores como Rh2C10C12 e Rh2C10C12-H2, conferem maior hidrofobicidade as moléculas, portanto elas tendem a se agregar em forma de micelas em concentrações menores, do que as Rh2C10C10 e Rh2C10C10-H2 com cadeias mais curtas.

A degradação de hidrocarbonetos, estimulada pela presença de biossurfactantes no meio de cultura, pode ser influenciada pela CMC. Zhang & Miller (1992) analisaram que a adição de ramnolipídeos aumentou significativamente a dispersão do octadecano em água. Foi observado um aumento de 0,009 para 125 mg/L (4 ordens de magnitude), com a adição de 50 mg do surfactante. Após este ponto, onde o ramnolipídeo atingiu a CMC, foi observado um lento aumento na dispersão, alcançando mais de 300 mg/L, com a adição de 500 mg do biossurfactante. No entanto, a mineralização deste hidrocarboneto, pela cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027 (produtora do surfactante testado), não obedeceu a mesma ordem, não sendo observado maior degradação antes de atingir a CMC. Porém com a adição do ramnolipídeo, os resultados de degradação foram maiores e apresentaram progressão linear uniforme.

## 5. CONCLUSÕES

Foi possível isolar microrganismos com potencial de crescimento em gasolina das áreas contaminadas com hidrocarbonetos selecionadas.

Foi possível avaliar a produção de biossurfactantes pelos microrganismos isolados, em meio de cultura contendo meio mineral e gasolina comercial como única fonte de carbono.

Foi constatada a degradação preferencial do etanol da gasolina comercial em meio mineral por alguns isolados bacterianos.

Constatou-se que para alguns isolados bacterianos, houve degradação preferencial da fração BTX e não do etanol presente na gasolina comercial em meio mineral.

Houve degradação da fração BTX da gasolina pura em meio mineral por alguns isolados.

Foi possível identificar as espécies selecionadas para os estudos de degradação e produção de ramnolipídeos, destacando-se os isolados identificados como *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia vietnamiensis*.

Os meios de cultura PPGAS e MSM + 2% de glicose, proporcionaram condições ótimas para a produção de biossurfactantes



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUHAMED, T. et al. Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. **Process Biochemistry**, Chicago, v.39, p.983-988, 2004.

ALEF, K. Estimation of microbial activities. In: ALEF, K. et al. **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1995. p.193-270.

AL-TAHAN, R. A. et al. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.8, p.2981-2985, 2000.

ALVAREZ, P. J.; VOGEL, T. M. Substrate interactions of benzene, toluene, and *para*-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.10, p. 3262-3268, 1991.

ALVAREZ, P.J.J.; HUNT, C.S. The effect of fuel alcohol on monoaromatic hydrocarbon biodegradation and natural attenuation. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, São Paulo, v.44, n.2, p.83-104, 2002.

ASUBEL, F.M. et al. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley and Sons, 1997. p.781.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, v.53, p. 495-508, 1997.

BARDI, L. et al. M. Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with  $\alpha$ -cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.27, p. 709-713, 2000.

BARTELS, J.; KNACKMUSS, H-J.; REINEKE W. Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halocatechols. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.47, n.6, p.500-505, 1984.

BENTO, F. M. et al. Degradation and corrosive activities of fungi in a diesel-mild steel-aqueous system. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.100, p.1-8, 2004.

BENTO, F. M. et al. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. **Microbiological Research**, Chicago, v.160, p.249-255, 2005.

BENINCASA, M. et al. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 85, p.1-8, 2004.

BHUPATHIRAJU, V. K. et al. Assessment of in-situ bioremediation at a refinery waste-contaminated site and an aviation gasoline contaminated site. **Biodegradation**, Amsterdam, v.19, p.79-90, 2002.

BICCA, F.C.; FLECK, L.C.; AYUB, M.A.Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus rubra* and *Rhodococcus erythropolis*. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.30, p.231-236, 1999.

BOTTON, S., PARSONS, J. R. Degradation of BTX by dissimilatory iron-reducing cultures. **Biodegradation**, Amsterdam, v. 18, p. 371-381, 2007.

BODOUR, A. A.; MAIER, R. M. Application of modified drop-collapse technique for surfactant quantification and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal Microbiology Methods**, Amsterdam, v.32, p.273-280, 1998.

BODOUR, A.A.; MAIER, R.M. Biosurfactants: types, screening methods and applications. In: *ENCYCLOPEDIA of Environmental Microbiology*. Hardcover: Gabriel Bitton, 2002. p.750-770.

BODOUR, A.A.; DREES, K.P.; MAIER, R.M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, n.6, p.3280-3287, 2003.

CAIRNEY, S. et al. The neurobehavioural consequences of petrol (gasoline) sniffing. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, New York, v.26, p.81-89, 2002.

CAMARGO, F.A.O. et al. *In vitro* reduction of hexavalent chromium by a cell-free extract of *Bacillus* sp. ES 39 stimulated by Cu<sup>++</sup>. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.62, n.5-6, p.569-573, 2003.

CETESB. **Relação de áreas contaminadas**. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas\\_contaminadas/relacao\\_areas.asp](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp)>. Acesso em: 15 nov. 2006.

CHARNG, M-K.; VOICE, T. C.; CRIDDLE, C. S. Kinetics of competitive inhibition and cometabolism in the biodegradation of benzene, toluene and *p*-xylene by *Pseudomonas* isolates. **Biotechnology and Bioengineering**, Berkeley, v.41, p.1057-1065, 1993.

CHEN, C. I.; TAYLOR, R. T. Thermophilic biodegradation of BTEX by two consortia of anaerobic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.48, p.121-128, 1997.

COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, n.2, p.224-229, 1987.

CORSEUIL, H.X.; MARINS, M.D. Contaminação de águas subterrâneas por derramamentos de gasolina: o problema é grave. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v.2, n.2, p.50-54, 1997.

CORSEUIL, H. X. et al. The influence of the gasoline Oxygenate Ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation. **Water Research**, Orlando, v.32, n.7, p.2065-2072, 1998.

CORSEUIL, H.X.; MARINS, M.D. Efeitos causados pela mistura de gasolina e álcool em contaminações de águas subterrâneas. **Boletim Técnico da Petrobrás**, Rio de Janeiro, v. 41, n.2, p.133-138. 1998.

CORSEUIL, H.X.; FERNANDES, M. Efeito do etanol no aumento da solubilidade de compostos aromáticos presentes na gasolina brasileira. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v.4, n.1, p.71-75, 1999.

CUNHA, C.D. **Avaliação da biodegradação de gasolina em solo**. 1996. 97f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.

CUNHA, C. D.; LEITE, S.G.F. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, n.31, p.4-49, 2000.

CUNHA, C. D. et al. *Serratia* sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. **Process Biochemistry**, Chicago, v. 39, p. 2277-2282, 2004.

DAKHEL, N. et al. Small-volume releases of gasoline in the vadose zone: impact of the additives MTBE and ethanol on groundwater quality. **Environmental Science Technology**, London, v.37, n.10, p.2127-2133, 2003.

DEEB, R.A. et al. Impact of ethanol on benzene plume lengths: microbial and modeling studies. **Journal of Environmental Engineering**, Amsterdam, v.128, n.9, p.868-875, 2002.

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

DIELS, L., LOOKMAN, R. **Advanced Science and technology for biological decontamination of sites affected by chemical and radiological nuclear agents**. Bélgica: Springer, 2007, p. 61-77.

DI LECCE, C. et al. Isolation and metabolic characterization of a pseudomonas stutzeri mutant able to grow on the three isomers of xylene. **Microbiology**, São Paulo, v.63, p.3279-3281, 1997.

EWEIS, J. B. et al. MTBE biodegradation in the presence of other gasoline components, California: U.C Davis, 2004. Disponível em: <<http://tsrtp.ucdavis.edu/mtbe/ngwapaper/homepage.html>>. Acesso em: 5 outubro 2004.

FIEBIG, R. et al. Biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the presence of a bioemulsifier produced on sunflower oil. **Biodegradation**, Amsterdam, v.8, p.67-75, 1997.

GIBSON, D. T.; PARALES, R. E.; Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. **Current Opinion Biotech**, Oxfordo, v.11, p.236-243, 2000.

GOLDSMITH, C. D.; BALDERSON, R. K. Biodegradation and growth kinetics of enrichment isolates on benzene, toluene and xylene. **Water Science and Technology**, London, v. 20, n. 11/12, p. 505-507, 1988.

GUERRA-SANTOS, L.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.48, n.2, p.301-305, 1984.

GÜLENSOY, N. ; ALVAREZ, J.J.P. Diversity and correlation of specific aromatic hydrocarbon biodegradation capabilities. **Biodegradation**, Amsterdam, v.10, p.331-340, 1999.

GUNTHER, N. W. et al. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 5, p. 2288-2293, 2004.

HABA, E. et al. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v.88, p. 379-387, 2000.

HANSON, K. G.; DESAI, J. D.; DESAI, A. J. A rapid and simple Screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, Kew, v.7, n.10, p.745-748, 1993.

HENDRICKX, B. et al. Alternative primers sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTXE degradation: Distribution of the genes in BTXE degrading isolates and in subsurface soils of a BTXE contaminated industrial site. **Journal of Microbiology Methods**, Amsterdam, v.64, p.250-265, 2006.

HOLMBERG, K. Natural surfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, California, v.6, p.148-159, 2001.

HOMMEL, R. K. Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon - utilizing microorganisms. **Biodeterioration**, Amsterdam, v.1, p.107-116, 1990.

JAVAHERI, et al. Anaerobic production of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.50, n.3, p.689-700, 1985.

JACQUES, R. J. S. **Biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos no solo**. 2005. 188 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

JACQUES, R., J., S. et al. Mass spectrometry analysis of surface tension reducing substances produced by *Pseudomonas citronellolis* PAH-degrading. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, 2008, (aceito para publicação).

JUNCA, H.; PIEPER, D. H. Functional gene diversity analysis in BTEX contaminated soils by means of PCR-SSCP DNA fingerprinting: comparative diversity assessment against bacterial isolates and PCR-DNA clone libraries. **Environmental Microbiology**, Braunschweig, v.6, n.2, p.95-110, 2004.

KIM, D. et al. Monocyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Rhodococcus* sp. Strain DK17. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.7, p.3270-3278, 2002.

KOCH, K. A. et al. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, n.3, p.4212-4219, 1991.

KUMAR, A. et al. Continuous operation of membrane bioreactor treating toluene vapors by *Burkholderia vietnamiensis* G4. **Chemical Engineering**, 2007, (aceito para publicação).

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

LAPERTOT, M. et al. Mass production of bacterial communities adapted to the degradation of volatile organic compounds (TEX). **Biodegradation**, Amsterdam, v.18, p.343-350, 2007.

LEE, S. J., CHOI, N. C., KIM, D. J. Effect of glucose on toluene biodegradation during transport through quartz sand column. **Geophysical Research Abstracts**, Lindau, v.9, p. 2514, 2007.

MAIER, R.M.; SOBERÓN-CHAVES, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.54, p.625-633, 2000.

MAIER, R. Biosurfactants: Evolution and diversity in bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, v.52, p.101-121, 2003.

MALINA, G.; GROTENHUIS, J.T.C.; RULKENS, W.H. Vapor extraction/Biovent sequential treatment of soil contaminated with volatile and semivolatile hydrocarbon mixtures. **Bioremediation Journal**, Philadelphia, v.6, n.2, p.159-176, 2002.

MARCHAL, R.; SOLANO-SERENA, F.; VANDECASTEELE, J.P. Gasoline and diesel oil biodegradation. **Oil Gas Science and Technology**, Paris, v.58, n.4, p.441-448, 2003.

MATA-SANDOVAL, J.C.; KARNIS, J.; TORRENTS, A. High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. **Journal of Chromatography**, Philadelphia, p:211-220, 1999.

MESARCH, M. B.; NAKATSU, C. H.; NIES, L. Development of catechol 2,3-dioxygenase specific primers for monitoring bioremediation by competitive quantitative PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.2, p.678-683, 2000.

MILLER, R. M.. Chapter 3 Surfactant-enhanced bioavailability of slightly soluble organic compounds. In: *Bioremediation Science and Applications* , p:33-54, 1995.

MILLER, R. M., ZHANG,Y. Chapter 4 Measurement of biosurfactant-enhanced solubilization and biodegradation of hydrocarbons. **Bioremediation Protocols: Humana Press: Nova Jersey**, p.59-66,1997.

MONTEIRO, S. A. et al. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. **Chemistry and Physics of Lipids**, Amsterdam, v. 147, p.1–13, 2007.

MORÁN, A. C. et al. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. **Biodegradation**, Amsterdam, v.11, p.65-71, 2000.

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

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, Amherst, v.133, p.183-198, 2005.

MURIEL, J.M.; BRUQUE, J.M.; OLÍAS, J.M.; JIMENEZ-SANCHEZ, A. Production of biosurfactants by *Cladosporium resinae*. **Biotechnology Letters**, Northwood, v.18, n.3, p.235-240, 1996.

NIESCHER, S., et al. Identification and structural characterization of novel trehalose dinocardiolipids from n-alkane-grown *Rhodococcus opacus* 1CP. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.70, p.605-611, 2006.

NITSCHKE, M.; PASTORE,G. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, Campinas, v. 25 (5), p.772-776, 2002.

NITSCHKE, M. et al. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology Progress**, Washington, v.21, p.1562-1566, 2005.

NOORDMAN, W.T.; JANSSEN, D.B. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n.9, p.4502-4508, 2002.

OCHOA-LOZA, F. J. et al. Effect of clays, metal oxides and organic matter on rhamnolipid biosurfactant sorption by soil. **Chemosphere**, Oxford, n.66, p.1634-1642, 2007.

OCHSNER, U. A. et al. Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.61, p.3503-3506, 1995.

OH, Y. S. et al. Interaction between benzene, toluene and *p*-xylene (BTX) during their biodegradation. **Biotechnology Bioengineering**, San Francisco, v.44, p.533-538, 1994.

OKEKE, B. C., FRANKENBERGER, Jr. W. T. Biodegradation of methyl butyl ether (MTBE) by a bacterial enrichment consortia and its monocultures isolates. **Microbiological Research**, Chicago, v.158, p. 99-106, 2003.

OKOH, A. et al. Potential of *Burkholderia cepacia* RQ1 in the biodegradation of heavy crude oil. **International Microbiology**, Barcelona, v. 4, p.83-87, 2001.

OLDENHUIS, R., VINK, R. L., JANSSEN, D. B., WITHOLT, B. Degradation of chlorinated and non-chlorinated aromatic solvents in soil suspensions by pure bacterial cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.30, p.211-217, 1989.

OLSON, J. J. et al. Biodegradation rates of separated diesel components. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Nova York, v.41, p.8-11, 2005.

OSMAN, M. et al. The Bioconversion of Ethanol to Biosurfactants and Dye. by a Novel Co-production Technique. **Journal of the American oil chemist's society**, Berlin, v.73, n. 7, p. 851-856, 1996.

O'SULLIVAN, L. A.; MAHENTHIRALINGAM, E. Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.41, p.8-11, 2005.

OTENIO, M. H. et al. Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCMI 852. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.36, p.258-261, 2005.

OWEN, A. S. et al. Re-evaluation of the hypothesis that biodegradable surfactants stimulate surface attachment of competent bacteria. **Microbiology**, London, n.143, p.3649-3659, 1997.

PERFUMO, A. et al. Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, v.72, p.132-138, 2006.

PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarboneto**. 2006. 61p. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho", Rio Claro, 2006.



PLAZA, G. A., ZJAWIONY, I., BANAT, I. M. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. **Petroleum Science & Engineering**, Amsterdam, v. 50, p.71-77, 2006.

POWERS, S. et al. The transport and Fate of ethanol and BTEX in Groundwater contaminated by gasohol. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Philadelphia, v.31, n.1, p.79-123, 2001.

POWLEY, M.W., CARLSON, G. P., Species comparison of hepatic and pulmonary metabolism of benzene. **Toxicology**, v.139, p.207-217, 1999.

RAHMAN, K.S.M. et al. Environmental bioremediation technologies. Berlin: Springer, 2007, p. 391-408.

RAHMAN, K.S.M. et al. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 25-32, 2002.

RAHMAN, K.S.M. et al. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnology Progress**, Washington, v. 18, p.1277-1281, 2002.

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

RATLEDGE, C. Hydrocarbons - Products of hydrocarbon - microorganism interaction. **Biodeterioration**, London, v.7, p.219-236, 1988.

RAIKHLIN-EISENKRAFT, B. et al. Determination of Urinary Hippuric Acid in Toluene Abuse. **Journal of Toxicology**, v.39, p.73-76, 2001.

RAZA, Z. A. et al. Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. **Biodegradation**, Amstredam, v.18, p.115-121, 2007.

REARDON, K. F. et al. Biodegradation kinetics of aromatic hydrocarbon mixtures by pure and mixed bacterial cultures, **Environmental Health Perspectives**, Cary, v.110, s.6, p.1005-1011, 2002.

REILING, H. E. et al. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.51, n.5, p.985-989, 1986.

REISFELD, A.; ROSENBERG, E.; GUTNICK, D. Microbial degradation of crude oil: factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure cultures. **Applied Microbiology**, Washington, v.24, n.3, p.363-368, 1972.

RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v.44, p.93-100, 1999.

RIDGWAY, H. F. et al., Identification and catabolic activity of well-derived gasoline degradation bacteria from a contaminated aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, n.11, p.3565-3575, 1990.

RICE, D. Background on ethanol. **Underground Tank Technology Update**, Madison, v.14, n.4, p.2-3, 2000.

SABATÉ, J.; VIÑAS, M.; SOLANAS, A. M. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v.54, p.19-25, 2004.

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

SENZOLO, C.; FRIGNANI, S.; PAVONI, B. Environmental and biological monitoring of occupational exposure to organic micropollutants in gasoline. **Chemosphere**, Oxford, v. 44, p.67-82, 2001.

SHIM, H.; SHIN, E.; YANG, S. A continuous fibrous-bed bioreactor for BTEX biodegradation by a co-culture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. **Advances in Environmental Research**, California, v.7, p.203-216, 2002.

SIDDIQUE, T. et al. Metabolism of BTXE and naphtha compounds to methane in oil sands tailings. **Environmental Science Technology**, Washington, v.41, n.7, p.2350-2356, 2007

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

SILVA, M. L. B., ALVAREZ, P. J. J. Effects of ethanol versus MTBE on benzene, toluene, ethylbenzene and xylene natural attenuation in aquifer columns. **Journal of Environmental Engineering**, Reston, v.128, n.9, p.862-865, 2002.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 25, p. 99-121, 2007.

SOLAIMAN, D. K. Y. Production of sophorolipids by *Candida bombicola* grown on soy molasses as substrate. **Biotechnology Letters**, Amsterdam, v.26, p.1241-1245, 2004.

SOLANO-SERENA, F. et al. Intrinsic capacities of soil microflorae for gasoline degradation. **Biodegradation**, Amsterdam, v.9, p.319-326, 1998.

SOLANO- SERENA, F. et al. Biodegradation of gasoline: kinetics, mass balance and fate of individual hydrocarbons. **Journal of Applied Microbiology**, London, v.86, p.1008-1016, 1999.

SOLANO-SERENA, F. et al. A Mycobacterium strain with extended capacities for degradation of gasoline hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.6, p.2392-2399, 2000.

SOUZA, C. S. et al. **Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de derivados de petróleo**. IN: Congresso Brasileiro de P&D em petróleo e gás, 3<sup>o</sup>, 2004, Salvador, Congresso Brasileiro de P&D em petróleo e gás, 3<sup>o</sup>, Salvador:IBP, 2004.

TAKAHATA, Y. et al. Rapid intrinsic biodegradation of benzene, toluene and xylene at the boundary of a gasoline-contaminated plume under natural attenuation. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, v.73, p.713-722, 2006.

TAKAMIYA, M. et al. A case of acute gasoline intoxication at the scene of washing a petrol tank. **Leg Med**, Tokyo, v.5 (3), p.165-169, 2003.

TIBURTIUS, E. R. L.; ZAMORA, P. P. Contaminação de águas por BTXE e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, São Paulo, v.27, p.441-446, 2004.

TULEVA, B.J.; IVANOV, G.R.; CHRISTOVA, N.E. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. **Zeitschrift Naturforsch**, Local, v.57c, p.356-360, 2002.

WAGNER, V. E.; GILLIS, R. J.; IGLEWSKI, B. H. Transcriptome analysis of quorum-sensing regulation and virulence factor expression in *Pseudomonas aeruginosa*. **Vaccine**, Surrey, v.22, p.15-20, 2004.

VAN DER MEI, H. C., COWAN, M. M., BUSSCHER, H. J. Physicochemical and structural studies on *Acinetobacter calcoaceticus* RAG- 1 and MR-481 - Two standard strains in hydrophobicity tests. **Current Microbiology**, New York, v.23, p. 337-341, 1991.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 24, p. 604-620, 2006.

WEI, Y., CHOU, C., CHANG, J. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, New York, v. 27, p. 146-154, 2005.

WITZIG, R. et al. Assessment of toluene/biphenyl dioxygenase gene diversity in benzene-polluted soils: Links between benzene biodegradation and genes similar to those encoding isopropylbenzene dioxygenases. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.72, n.5, p.3504-3514, 2006.

WILLUMSEN, P.A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soil, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, Amsterdam, v.7, p.415-423, 1997.

WU, J.; JU, L.K. Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.59, p.193-2002, 1998.

YADAV, J. S.; REDDY, C. A. Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX) by lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.3, p.756-762, 1993.

YOUSSEF, N. H. et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 56, p.339-347, 2004.

YU, H.; KIM, B. J.; RITTMANN, B. E. The role of intermediates in biodegradation of benzene, toluene and *p*-xylene by *Pseudomonas putida* F1. **Biodegradation**, Amsterdam, v.12, p.455-463, 2001.

ZHANG, Y.; MILLER, R. M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* Rhamnolipid surfactant (biosurfactant). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.10, p.3276-3282, 1992.

ZHANG, Y.; MILLER, R. M. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.6, p.2101-2106, 1994.

Zhang, Y.; Miller, R. M. Effect of Rhamnolipid (Biosurfactant) Structure on solubilization and Biodegradation of n-Alkanes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.6, p.2247-2251, 1995.

## 8. APÊNDICE

### 8.1 Meios para crescimento microbiano

#### 8.1.1 Meio Mineral

##### Ingredientes

Macronutrientes		g/l
KCl		0,70
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		2,00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		3,00
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>		1,00
Micronutrientes		g/l
MgSO <sub>4</sub>		4,00
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O		8,20
FeSO <sub>4</sub>		2,00
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O		0,36
MnCl <sub>2</sub>		0,20
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O		0,31
CaCl <sub>2</sub>		0,20
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O		0,26

O meio mineral é uma mistura de 1L da solução de macronutrientes e 1 ml da solução de micronutrientes. Autoclavar a 121 °C, 1 atm, durante 15 minutos, pH final 7,2.

### 8.1.2 Ágar Nutritivo

Ingredientes	g/l
Extrato de carne	3,00
Peptona bacteriológica	5,00
Agar	15,00

Autoclavar a 121 °C, 1 atm, durante 15 minutos, pH final 7,2.

### 8.1.3 Caldo Nutritivo

Ingredientes	g/l
Extrato de carne	3,00
Peptona bacteriológica	5,00

Autoclavar a 121 °C, 1 atm, durante 15 minutos, pH final 7,2.

### 8.1.4 Meio Mineral com Cloreto de Trifeniltetrazólio (TTC)

Ingredientes	g/L
Cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)	0,025
Meio mineral	Apêndice 8.1.1

Diluir o TTC em 100 ml de água destilada e em seguida, misturar a 400 ml de meio mineral. Autoclavar a 121 °C, 1 atm, durante 15 minutos, pH final 7,2.

### 8.1.5 Teste colorimétrico

Ingredientes	g/L
CTAB	0,20
Azul de metileno	0,005
Glucose	20,00
Meio mineral	Apêndice 8.1.1

### 8.1.6 Meio MSM + 2% glicose para produção de biossurfactantes

Ingredientes	g/l
NaNO <sub>3</sub>	2,50
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,40
NaCl	1,00
KCl	1,00
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,05
Glicose	20,00
	ml/L
Ácido Fosfórico (85%)	10,00

O meio MSM é uma mistura de 1L dos ingredientes citados acima e 1 ml da solução de micronutrientes (Apêndice 8.1.1). Autoclavar o meio, sem o ácido fosfórico, a 121 °C, 1 atm, durante 15 minutos. O ácido fosfórico é esterilizado, utilizando membranas filtrantes com porosidade de 0,22 µm, após adicionar a solução e ajustar pH para 7,2.

### 8.1.7 Meio PPGAS para produção de biossurfactantes

PPGAS	
Ingredientes	g/l
NH <sub>4</sub> Cl	1,00
KCl	1,50
MgSO <sub>4</sub>	0,22
TRIS-HCl	14,50
Glicose	5,00
Peptona	10,00

Autoclavar a 121 °C, 1 atm, durante 15 minutos, pH final 7,2.

### 8.1.8 Meio com óleo diesel ou óleo de soja para produção de biossurfactantes

Ingredientes	
Meio mineral	Apêndice 8.1.1
Óleo de soja/Óleo de soja	2%

Adicionar o meio mineral (Apêndice 8.11) e 2% de óleo diesel/óleo de soja. Autoclavar o meio mineral, sem o óleo diesel/óleo de soja, a 121 °C, 1 atm, durante 15 minutos. O óleo diesel/óleo de soja é esterilizado, utilizando membranas filtrantes com porosidade de 0,22 µm, após adicionar a solução e ajustar pH para 7,2.



## 8.2 Reagentes para a extração do DNA cromossomal e gel de agarose

### Tampão TE

Tris-HCl 1M pH 8.0	1,00 mL
EDTA 0,5M pH 8.0	2,00 mL
Água destilada	100,00 mL

### SDS 10%

Dodecil sulfato de sódio	10,0 g
Água destilada	100,00mL

### CTAB/NaCl

NaCl	4,10 g
CTAB	10,00 g
Água destilada	100,00mL

### Gel de agarose 1%

Agarose	1,00g
Tampão TAE 1x	100,00 mL

### 8.3 Curvas de linearidade do benzeno, tolueno e xilenos

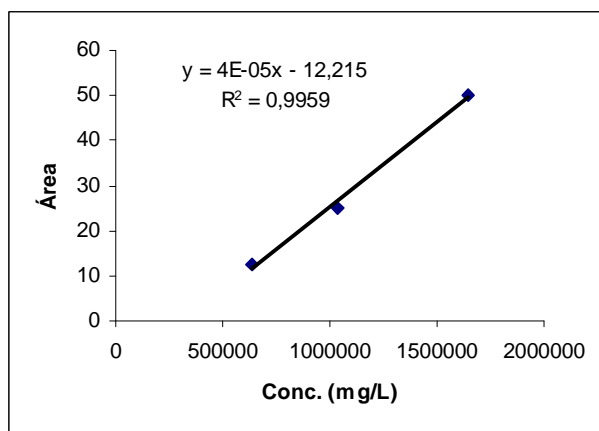


FIGURA 1. Curva de linearidade com soluções de meio mineral e benzeno na faixa de concentrações de 12,5, 25 e 50 (mg/L).

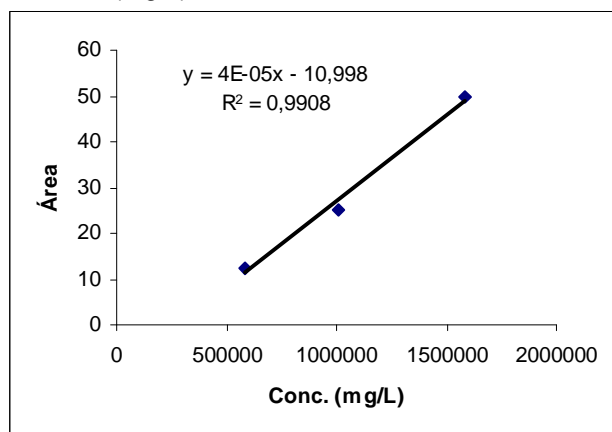


FIGURA 2. Curva de linearidade com soluções de meio mineral e tolueno na faixa de concentrações de 12,5, 25 e 50 (mg/L).

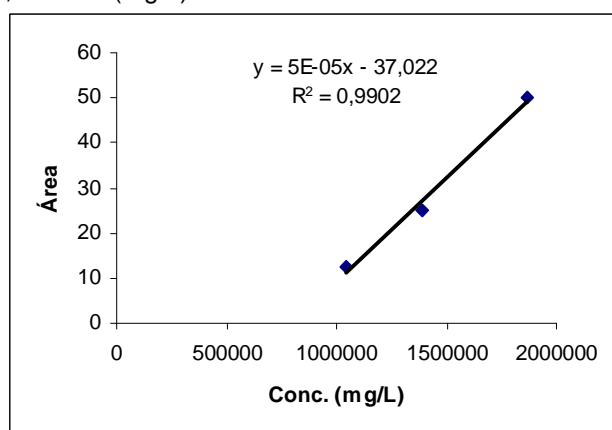


FIGURA 3. Curva de linearidade com soluções de meio mineral e xilenos na faixa de concentrações de 12,5, 25 e 50 (mg/L).

## 8.4 Cromatogramas

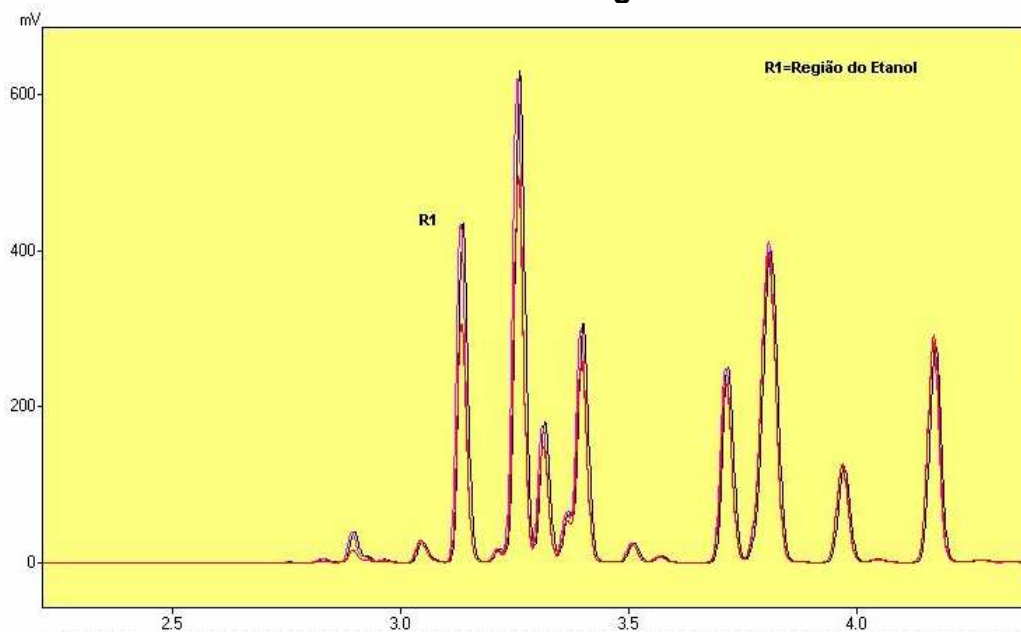


Fig. 4	Área E
Controle 0h	631552
Controle 72h	631385
UFRGS38	442949

Figura 4: Cromatograma da gasolina comercial em meio sais minerais, com expansão em torno do tempo de retenção do etanol. Controles 0 horas, 72 horas e degradação do etanol, pelo isolado *P. aeruginosa* UFRGS38.

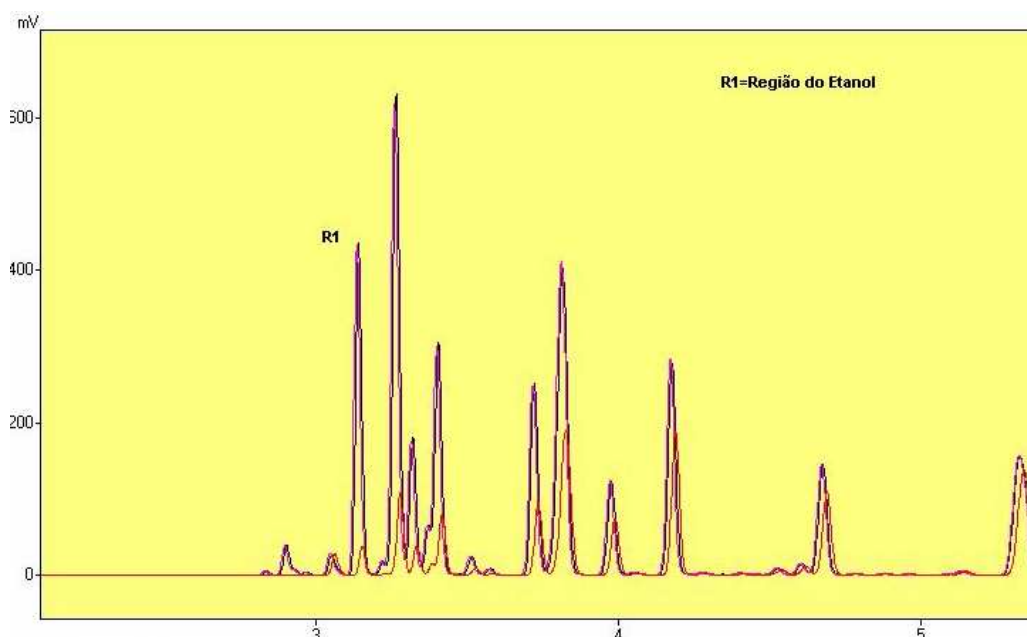


Fig. 5	Área E
Controle 0h	631552
Controle 72h	631385
UFRGS123	52058

Figura 5: Cromatograma da gasolina comercial em meio sais minerais, com expansão em torno do tempo de retenção do etanol. Controles 0 horas, 72 horas e degradação do etanol, pelo isolado UFRGS123.

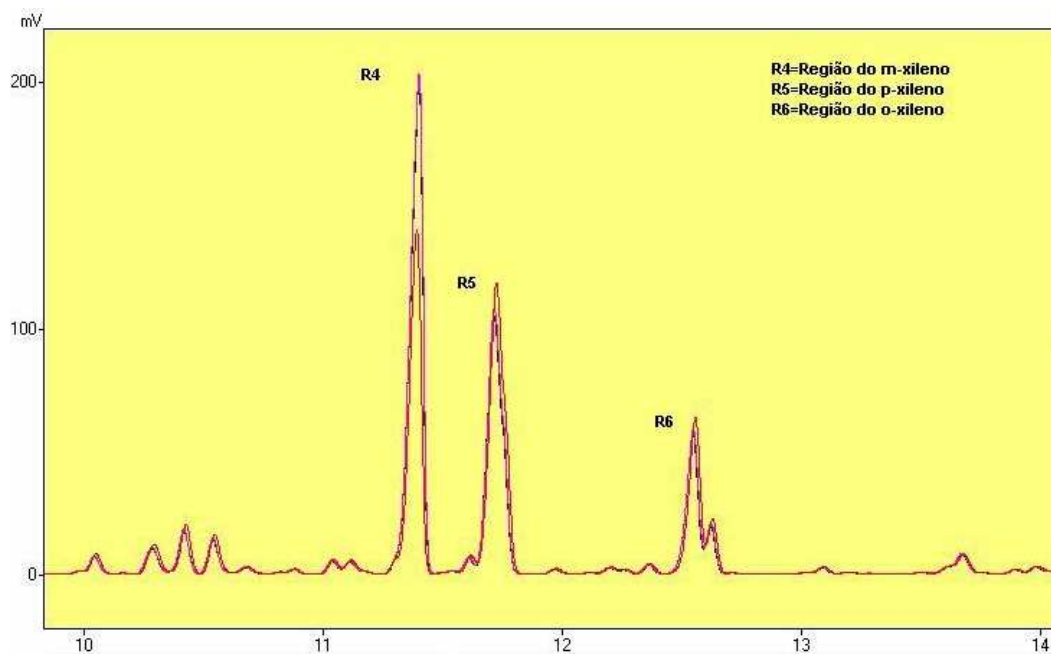


Fig. 6	Área X1
Controle 0h	745020
Controle 72h	766790
UFRGS62	494826

Figura 6: Cromatograma da gasolina comercial em meio sais minerais, com expansão em torno do tempo de retenção dos xilenos. Controles 0 horas, 72 horas e degradação dos xilenos, pelo isolado *B. vietnamiensis* UFRGS62.

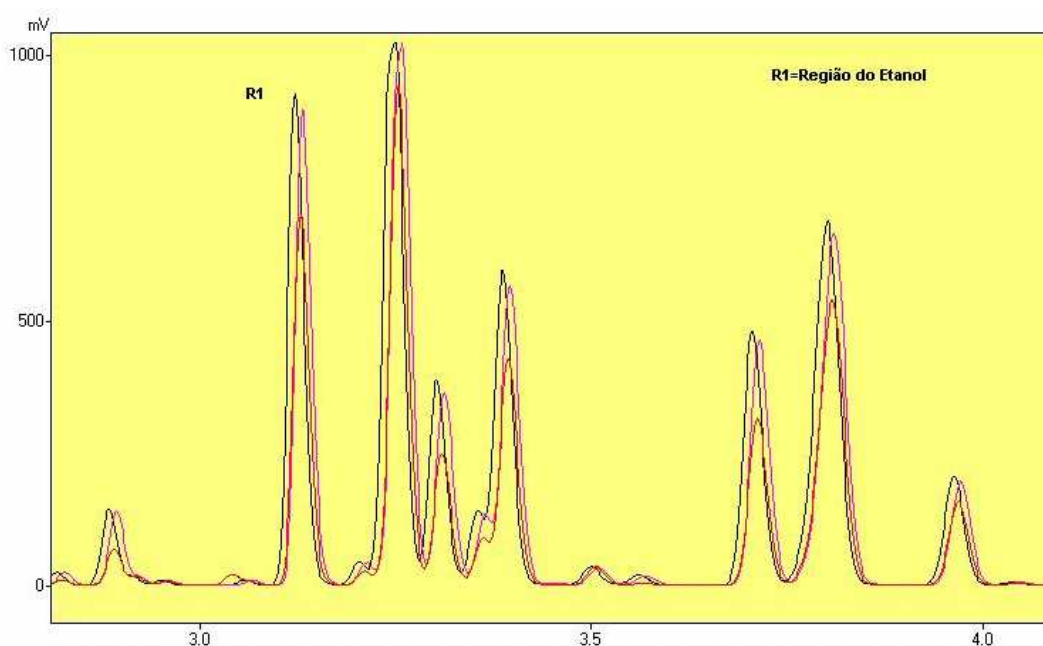


Fig. 7	Área E
Controle 0h	1439946
Controle 72h	1439946
UFRGS63	1021827

Figura 7: Cromatograma da gasolina comercial em meio sais minerais, com expansão em torno do tempo de retenção do etanol. Controles 0 horas, 72 horas e degradação do etanol, pelo isolado UFRGS63.

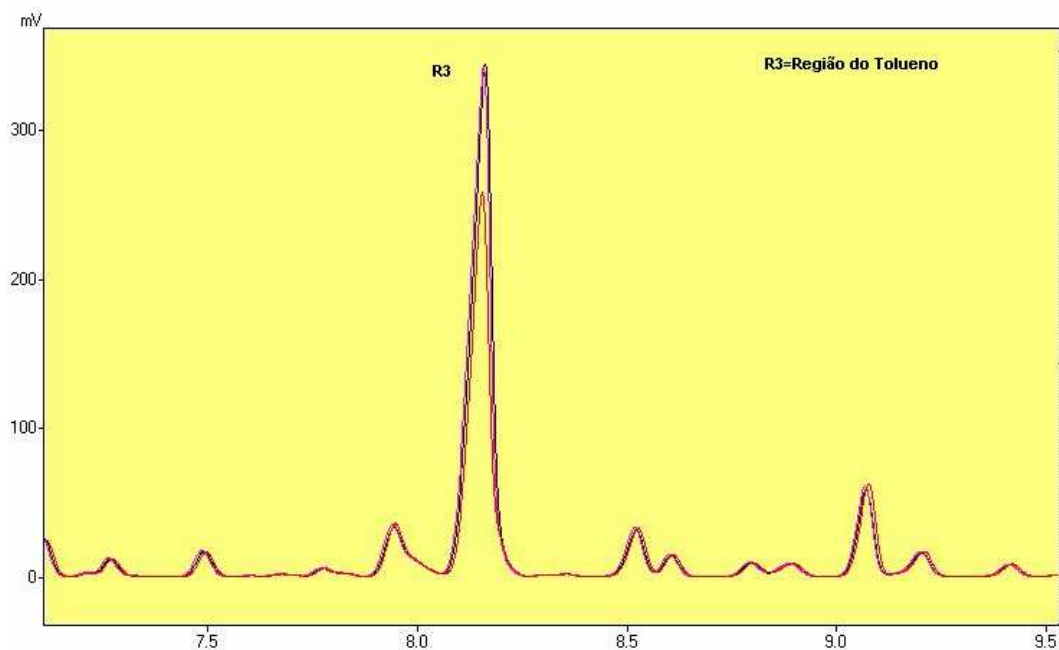


Fig. 8	Área T
Controle 0h	1192152
Controle 72h	1197982
UFRGS63	852798

Figura 8: Cromatograma da gasolina comercial em meio sais minerais, com expansão em torno do tempo de retenção do tolueno. Controles 0 horas, 72 horas e degradação do tolueno, pelo isolado UFRGS63.

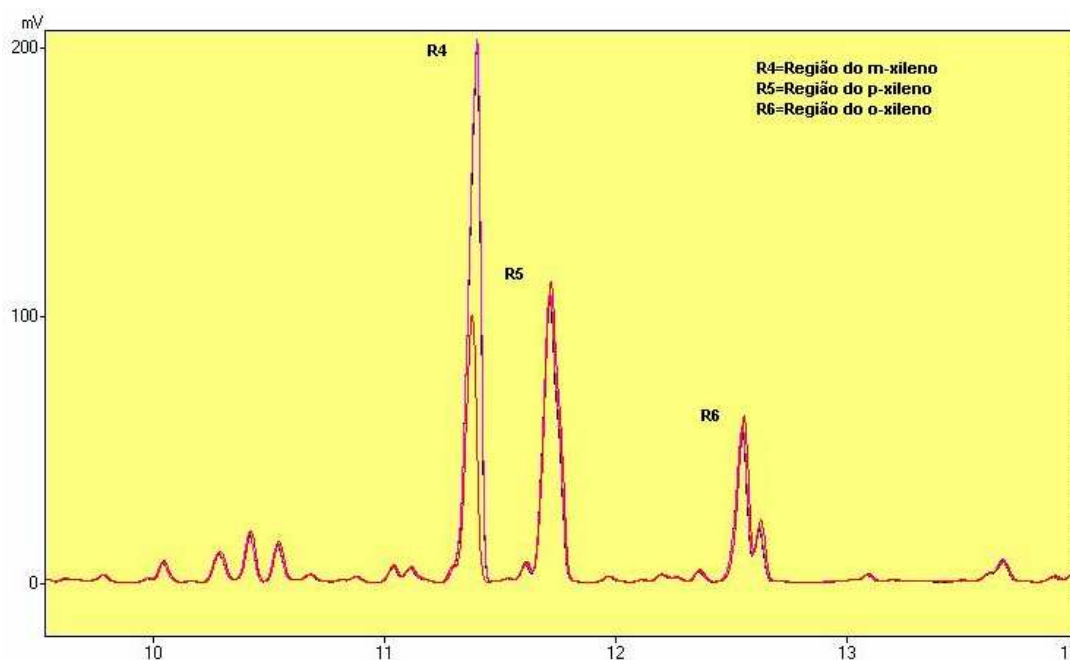


Fig. 9	Área X1
Controle 0h	745020
Controle 72h	766790
UFRGS63	327421

Figura 9: Cromatograma da gasolina comercial em meio sais minerais, com expansão em torno do tempo de retenção dos xilenos. Controles 0 horas, 72 horas e degradação dos xilenos, pelo isolado UFRGS63.

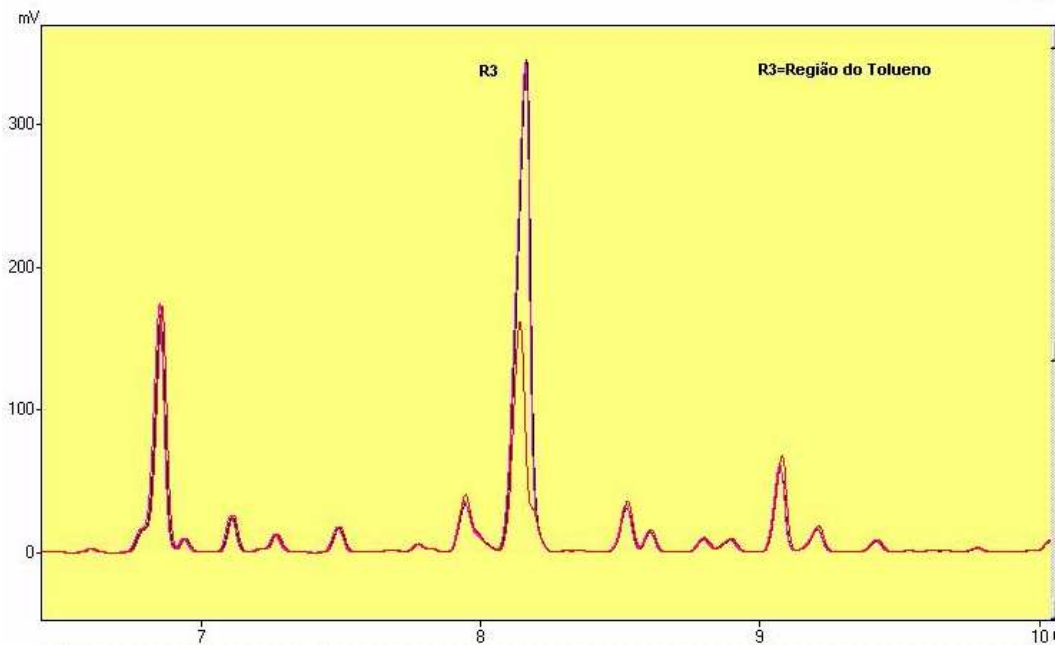


Fig. 10	Área T
Controle 0h	1192152
Controle 72h	1197982
UFRGS68	542734

Figura 10: Cromatograma da gasolina comercial em meio sais minerais, com expansão em torno do tempo de retenção do tolueno. Controles 0 horas, 72 horas e degradação do tolueno, pelo isolado *B. vietnamiensis* UFRGS68.

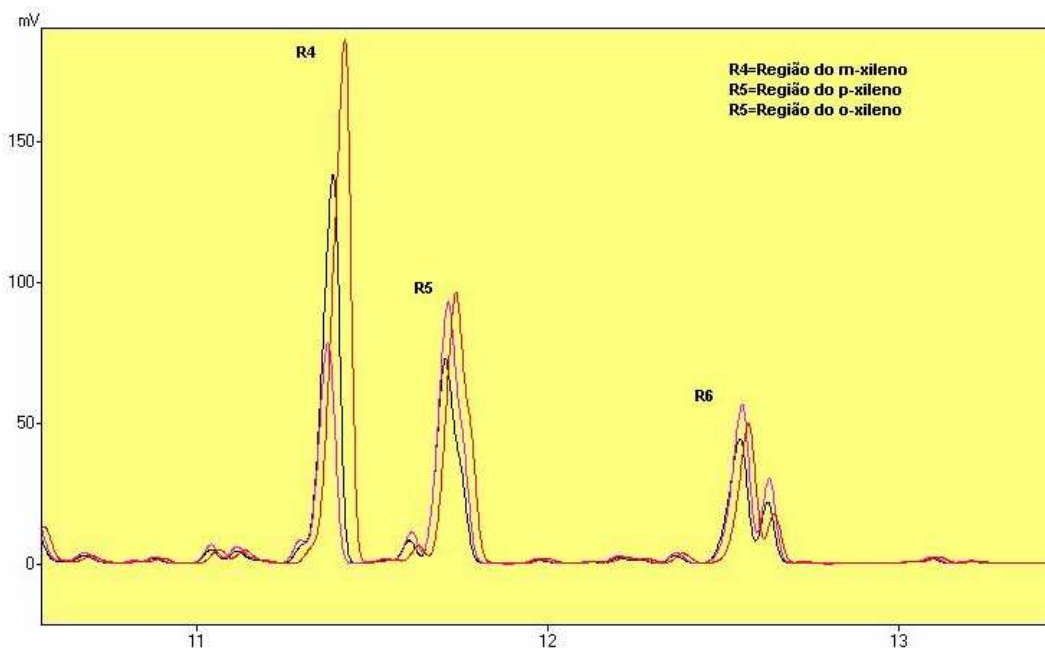


Fig. 11	Área X1
Controle 0h	460221
Controle 72h	482355
UFRGS62	257247

Figura 11: Cromatograma da gasolina pura em meio sais minerais, com expansão em torno do tempo de retenção dos xilenos. Controles 0 horas, 72 horas e degradação dos xilenos, pelo isolado *B. vietnamiensis* UFRGS62.

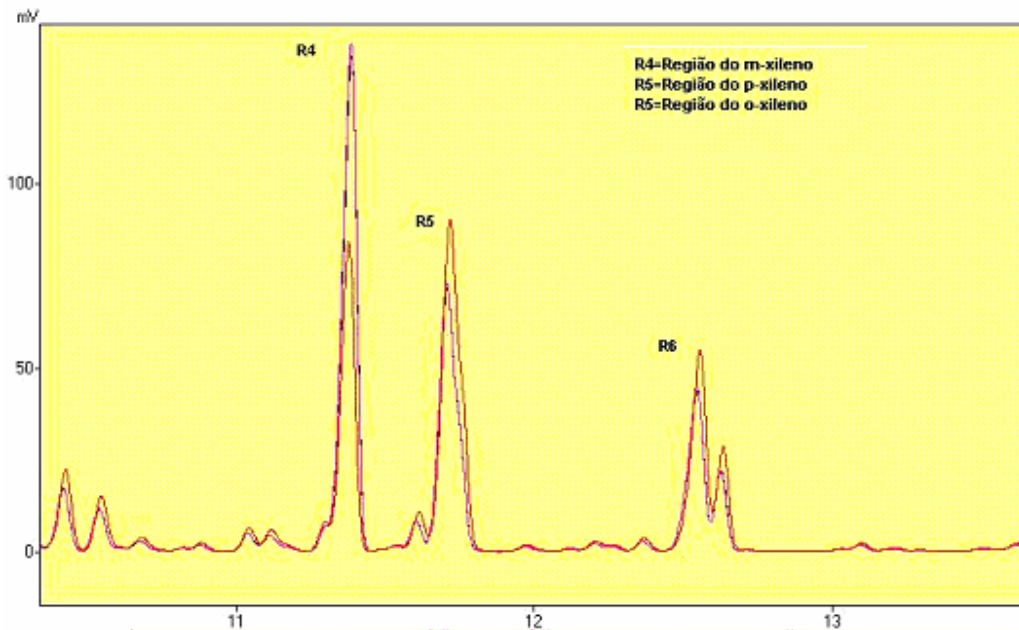


Fig. 12	Área X1
Controle 0h	460221
Controle 72h	482355
UFRGS63	274775

Figura 12: Cromatograma da gasolina pura em meio sais minerais, com expansão em torno do tempo de retenção dos xilenos. Controles 0 horas, 72 horas e degradação dos xilenos, pelo isolado UFRGS63.

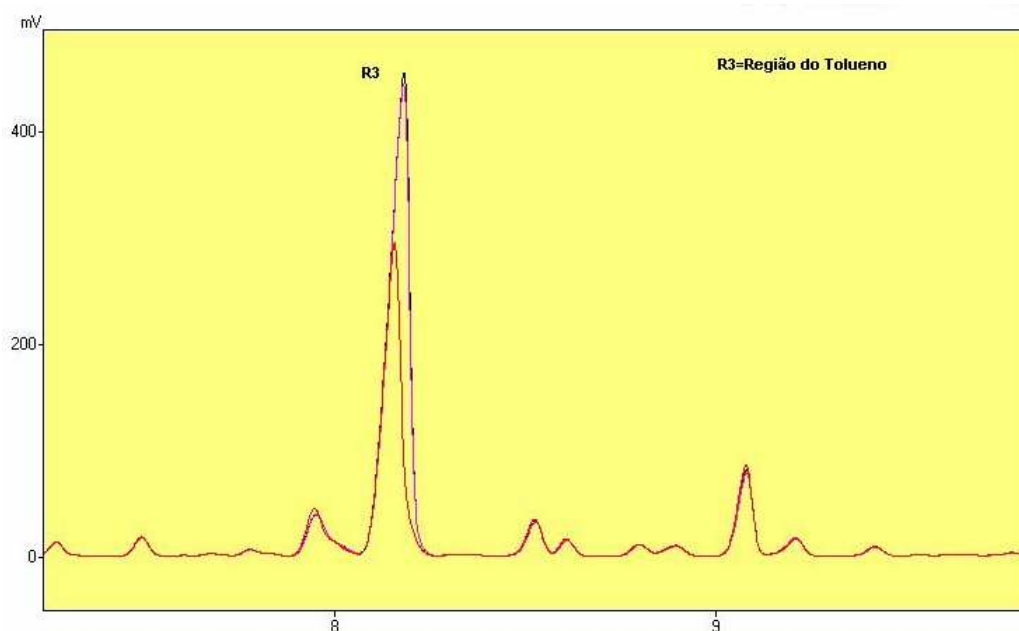


Fig. 13	Área T
Controle 0h	1728590
Controle 72h	1678595
UFRGS68	1008505

Figura 13: Cromatograma da gasolina pura em meio sais minerais, com expansão em torno do tempo de retenção do tolueno. Controles 0 horas, 72 horas e degradação do tolueno, pelo isolado *B. vietnamiensis* UFRGS68.

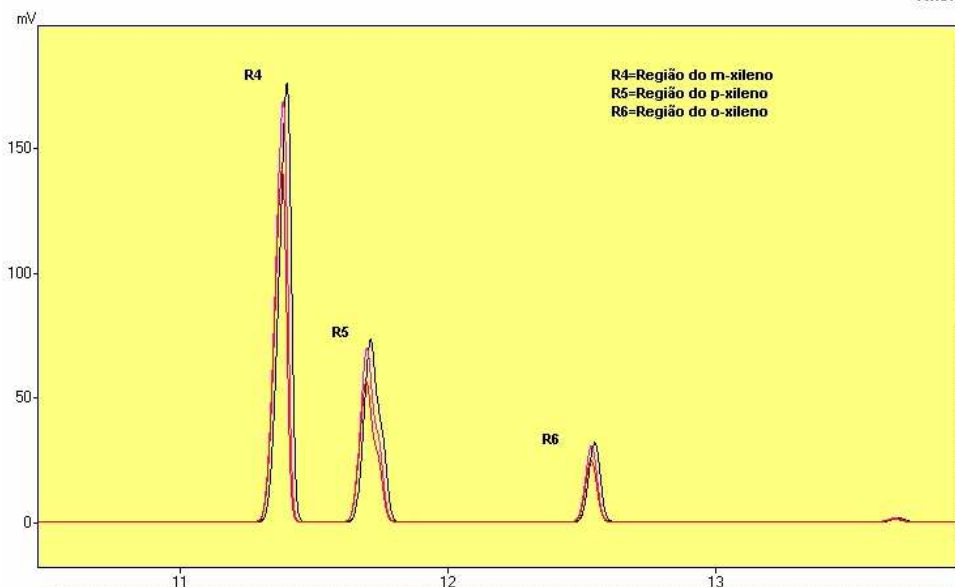


Fig. 14	Área X2	Área X3
Controle 0h	317377	98973
Controle 72h	295371	93809
UFRGS62	238502	75547

Figura 14: Cromatograma da fração BTX, ensaio junto, em meio sais minerais, com expansão em torno do tempo de retenção dos xilenos. Controles 0 horas, 72 horas e degradação dos xilenos, pelo isolado *B. vietnamiensis* UFRGS62.

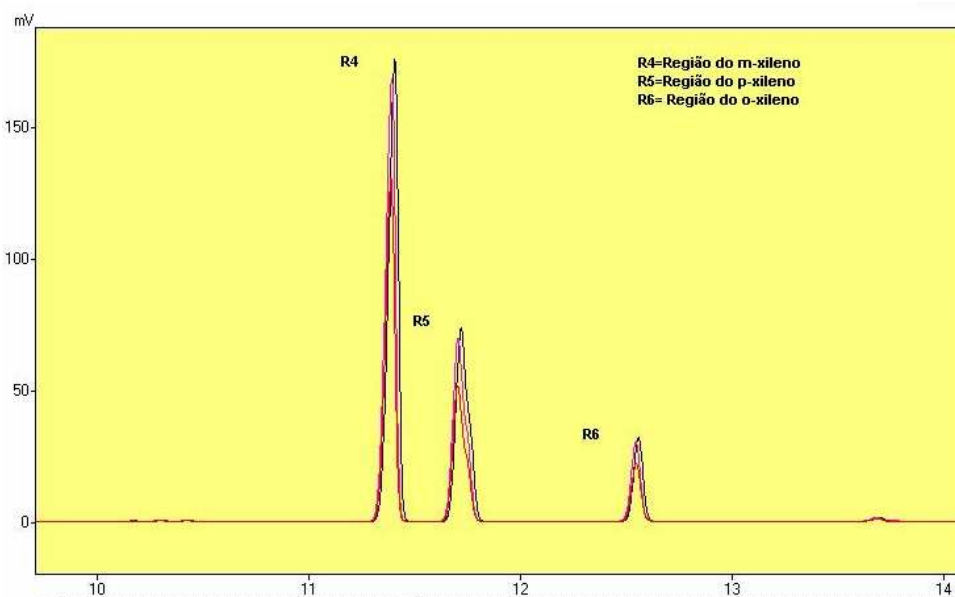


Fig. 15	Área X2	Área X3
Controle 0h	317377	98973
Controle 72h	295371	93809
UFRGS63	213926	68632

Figura 15: Cromatograma da fração BTX, ensaio junto, meio sais minerais, com expansão em torno do tempo de retenção dos xilenos. Controles 0 horas, 72 horas e degradação dos xilenos, pelo isolado UFRGS63.



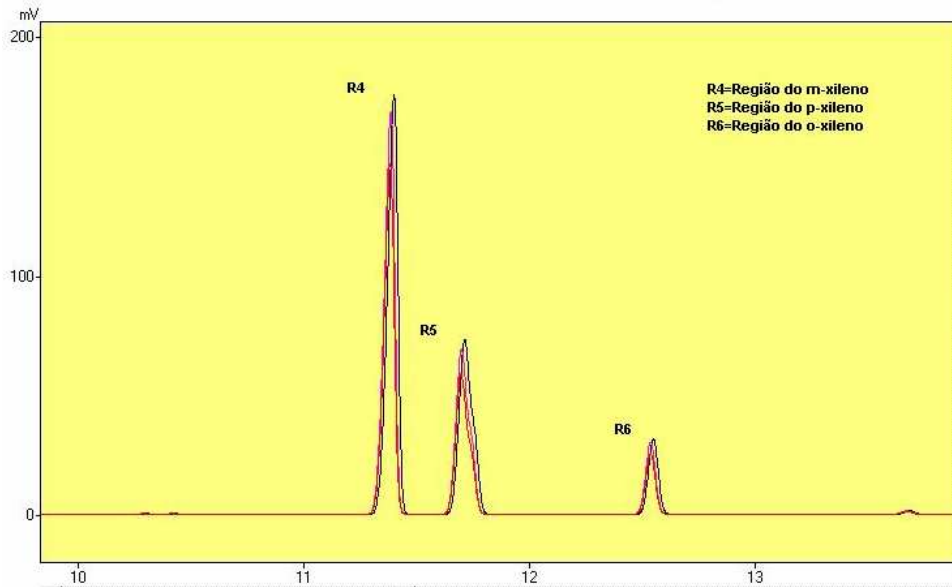


Fig. 16	Área X2	Área X3
Controle 0h	317377	98973
Controle 72h	295371	93809
UFRGS68	246330	78454

Figura 16: Cromatograma da fração BTX, ensaio junto, em meio sais minerais, com expansão em torno do tempo de retenção dos xilenos. Controles 0 horas, 72 horas e degradação dos xilenos, pelo isolado *B. vietnamiensis* UFRGS68.

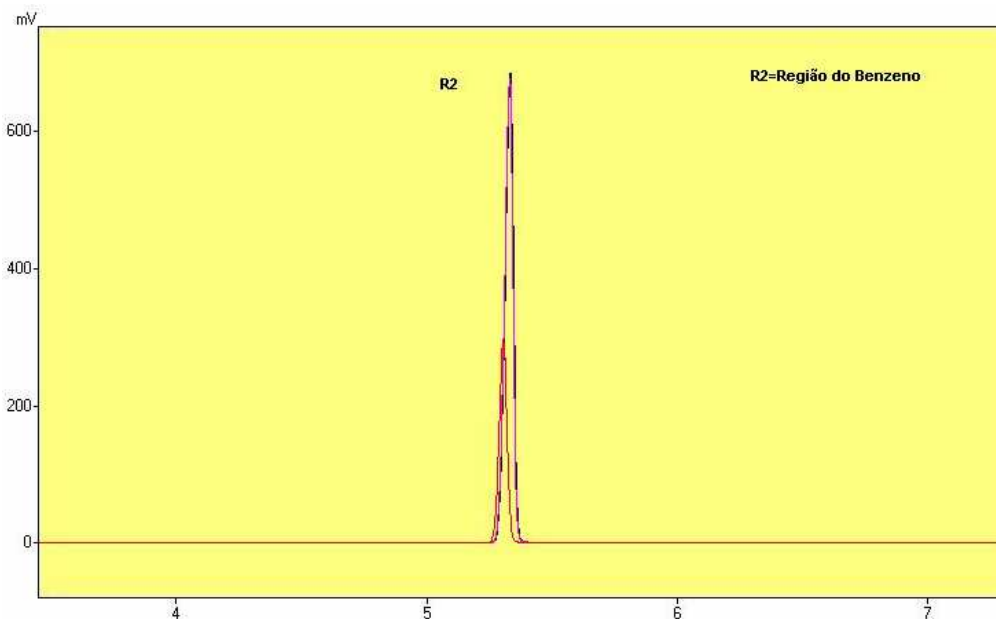


Fig. 17	Área B
Controle 0h	1634254
Controle 72h	1605673
UFRGS62	659401

Figura 17: Cromatograma da fração BTX, ensaio separado, em meio sais minerais, com expansão em torno do tempo de retenção do benzeno. Controles 0 horas, 72 horas e degradação do benzeno, pelo isolado *B. vietnamiensis* UFRGS62.

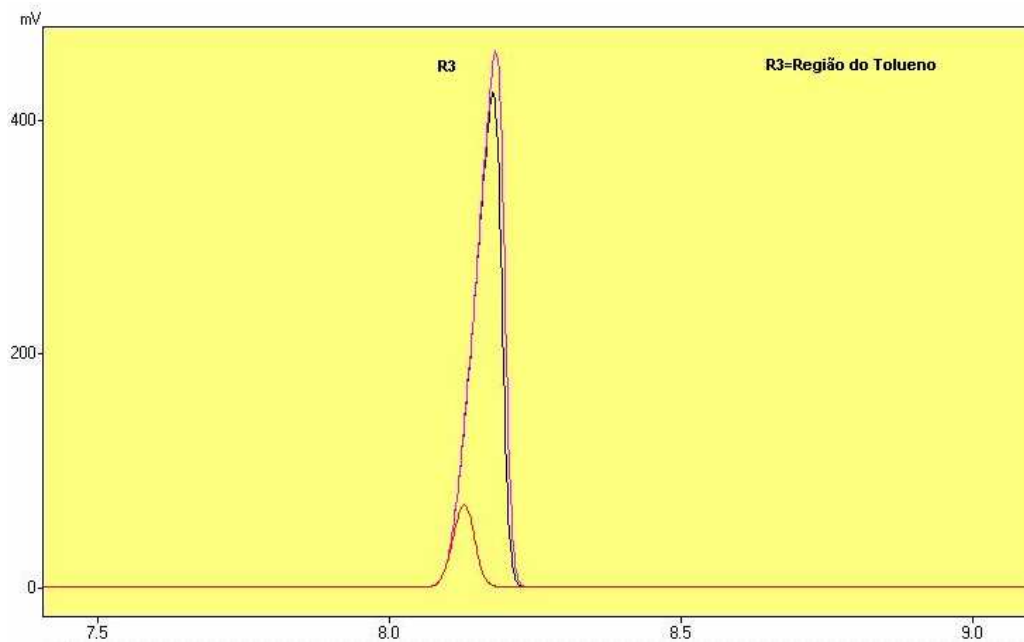


Fig. 18	Área T
Controle 0h	1444516
Controle 72h	1627609
UFRGS62	190495

Figura 18: Cromatograma da fração BTX, ensaio separado, em meio sais minerais, com expansão em torno do tempo de retenção do tolueno. Controles 0 horas, 72 horas e degradação do tolueno, pelo isolado *B. vietnamiensis* UFRGS62.

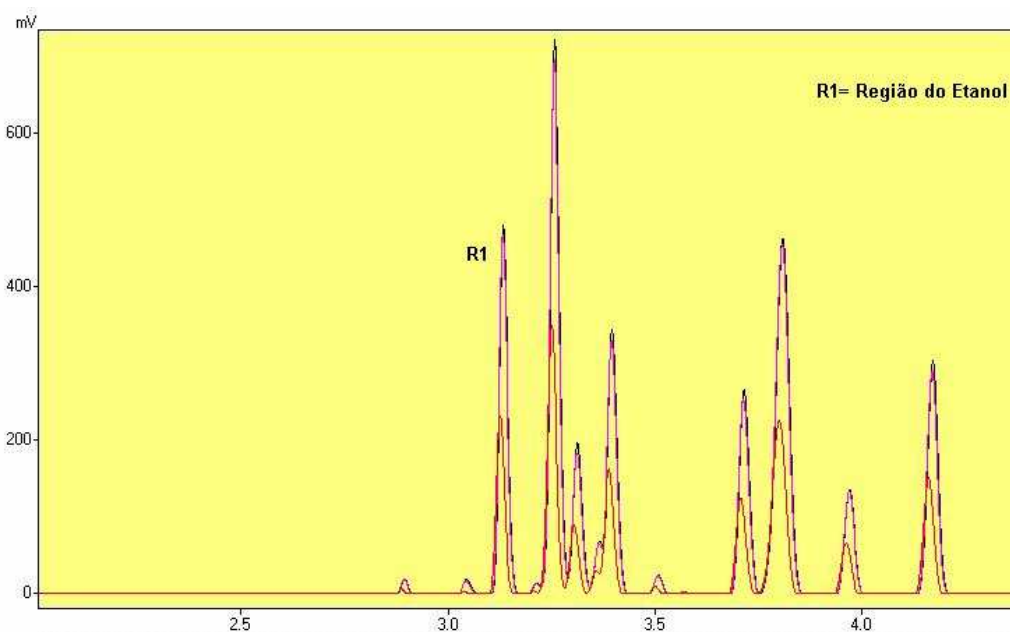


Fig. 19	Área E
Controle 0h	690556
Controle 72h	676947
UFRGS62	327773

Figura 19: Cromatograma da gasolina comercial com adição de 0,2% de glicose, em meio sais minerais, com expansão em torno do tempo de retenção do etanol. Controles 0 horas, 72 horas e degradação do etanol, pelo isolado *B. vietnamiensis* UFRGS62.

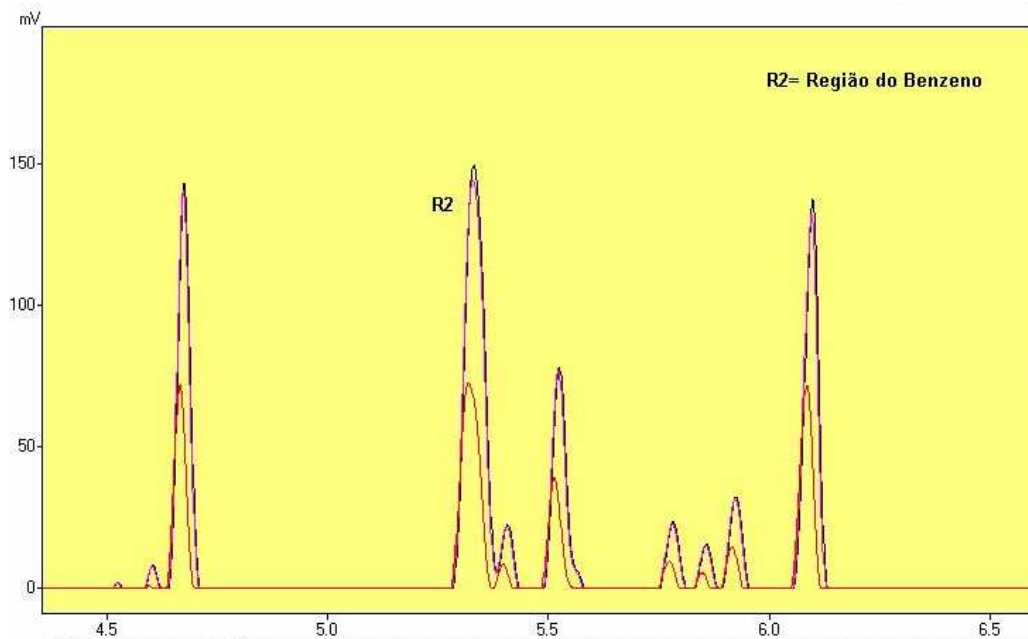


Fig. 20	Área B
Controle 0h	454807
Controle 72h	442119
UFRGS62	209853

Figura 20: Cromatograma da gasolina comercial com adição de 0,2% de glicose, em meio sais minerais, com expansão em torno do tempo de retenção do benzeno. Controles 0 horas, 72 horas e degradação do benzeno, pelo isolado *B. vietnamiensis* UFRGS62.

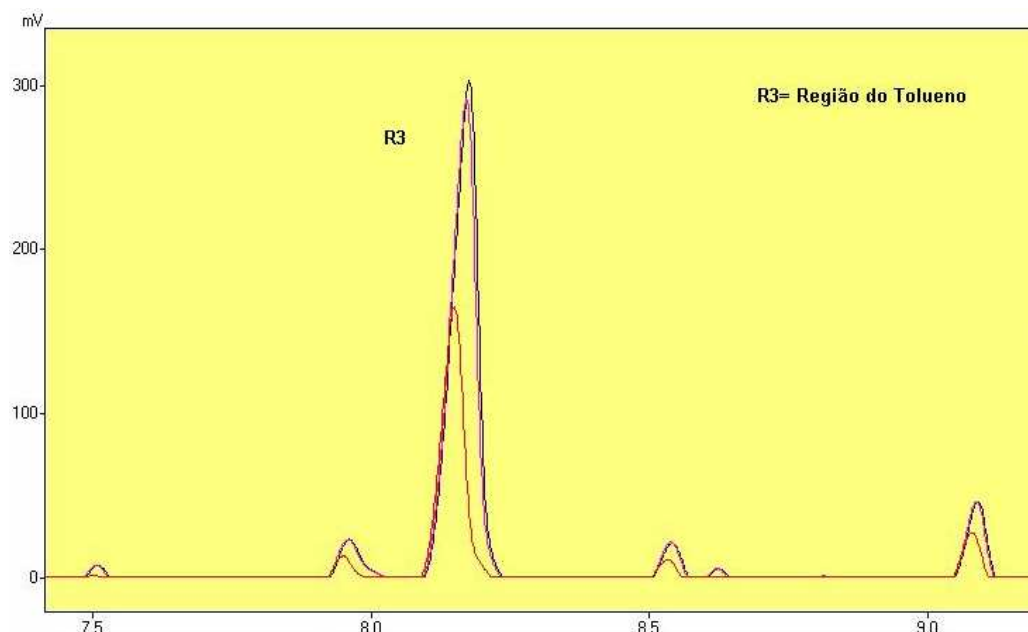


Fig. 21	Área T
Controle 0h	984758
Controle 72h	939074
UFRGS62	470329

Figura 21: Cromatograma da gasolina comercial com adição de 0,2% de glicose, em meio sais minerais, com expansão em torno do tempo de retenção do tolueno. Controles 0 horas, 72 horas e degradação do tolueno, pelo isolado *B. vietnamiensis* UFRGS62.

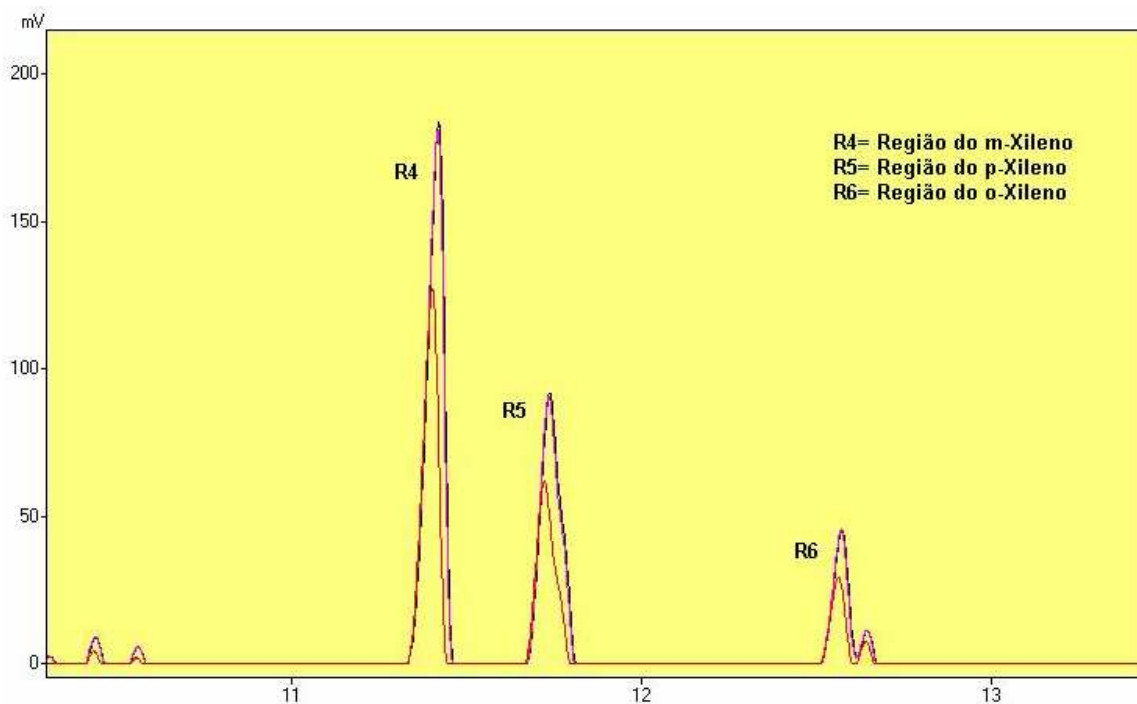


Fig. 22	Área X1	Área X2	Área X3
Controle 0h	619499	373938	134347
Controle 72h	612898	365988	132736
UFRGS62	393800	228445	79666

Figura 22: Cromatograma da gasolina comercial com adição de 0,2% de glicose, em meio sais minerais, com expansão em torno do tempo de retenção dos xilenos. Controles 0 horas, 72 horas e degradação dos xilenos, pelo isolado *B. vietnamiensis* UFRGS62.