



**Universidade de  
Aveiro 2010**

Departamento de Biologia

**António Miguel  
de Oliveira Louvado**

**Isolamento e Caracterização de  
Bactérias Resistentes a Surfactantes**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Marinha, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e co-orientação do Doutor Newton Carlos Marcial Gomes, Investigador Auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM)

Dedico este trabalho ao meu pai.

## O júri

Presidente Prof. Doutor Victor Manuel dos Santos Quintino  
Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Vogal Doutor Ricardo Jorge Guerra Calado (arguente)  
Investigador Auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar

Vogal Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves  
Cunha (orientadora)  
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Vogal Doutor Newton Carlos Marcial Gomes (co-orientador)  
Investigador Auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar

## **Agradecimentos**

À Professora Ângela Cunha, orientadora da tese, pela ajuda, disponibilidade e confiança dada.

Ao Professor Newton Gomes pela ajuda nas técnicas de biologia molecular e partilha de conhecimentos.

Este trabalho foi parcialmente suportado pelo CESAM (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar)lo.

À Ana Luísa Santos e ao Francisco Coelho pela constante disponibilidade para responder às minhas dúvidas e pela ajuda no trabalho laboratorial.

Aos meus colegas André, Fábio, Sara e Patrícia pela ajuda no trabalho laboratorial.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada e Ambiental (LMAA) e do Laboratório de Estudos Moleculares em Ambiente Marinho (LEMAM) pela disponibilidade, ajuda e momentos de convívio.

Aos meus amigos pelo bons momentos vividos em Aveiro.

À minha mãe por todo, particularmente pelo espírito de perseverança educado em mim, pois sem isso muito dificilmente chegaria a este ponto.

**Palavras-chave**

Microcamada superficial marinha, bacterioneuston, surfactantes, biossurfactantes, biorremediação, *Pseudomonas*

## Resumo

As estratégias de biorremediação de hidrocarbonetos envolvem frequentemente a aplicação de surfactantes de modo a aumentar biodisponibilidade de compostos pouco solúveis em água. Todavia, os surfactantes sintéticos são tóxicos para muitas bactérias degradadoras de hidrocarbonetos, reduzindo a taxa de mineralização do poluente. Uma estratégia interessante seria o recurso a bactérias com ambas as capacidades: degradar poluentes hidrofóbicos e resistir aos surfactantes. A microcamada superficial marinha (*sea surface microlayer* - SML) constitui a interface entre a hidrosfera e a atmosfera, sendo geralmente definida como o milímetro superior da coluna de água. Este compartimento natural é simultaneamente rico em poluentes hidrofóbicos e surfactantes. Neste trabalho pesquisou-se a SML quanto à presença de bactérias resistentes a surfactantes através de culturas de enriquecimento com dodecil sulfato de sódio (SDS – *sodium dodecyl sulfate*) e brometo de cetil trimetilamônio (CTAB – *cetyl trimethylammonium bromide*). Sobre um subconjunto dos isolados obtidos, realizou-se PCR (*polymerase chain reaction*) para detecção do gene *gacA* - um marcador específico de *Pseudomonas* – e do gene *ndo* – codificante para a naftaleno dioxigenase, uma enzima envolvida na degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH - *polycyclic aromatic hydrocarbons* -). Os isolados foram ainda testados quanto à produção de biossurfactantes. Os resultados obtidos revelam uma elevada abundância de bactérias resistentes a surfactantes na SML. O PCR do gene *gacA* revelou a predominância de *Pseudomonas* no subconjunto de isolados (44%). Contudo, não foi obtida amplificação para o gene *ndo*. A produção de biossurfactantes foi detectada por cultura em meio sólido em 5 isolados, todos pertencentes ao género *Pseudomonas*. A sequenciação do gene 16S do RNA ribossomal evidencia similaridade filogenética entre os isolados identificados e estirpes produtoras de biossurfactantes e degradadoras de poluentes hidrofóbicos isoladas em diferentes ambientes naturais.

**Keywords**

sea surface microlayer, bacterioneuston, surfactants, biosurfactants, bioremediation, *Pseudomonas*

## Abstract

Bioremediation efforts sometimes rely on surfactants to enhance hydrocarbon bioavailability. However, most synthetic surfactants employed can be sometimes toxic to degrading microorganisms, reducing the clearance rate of the pollutant. An interesting strategy is to employ bacteria with both the desired attributes: biodegradative capability and tolerance to surfactants. The sea surface microlayer (SML) is the uppermost layer of the water column and represents an interface between the hydrosphere and atmosphere. It is simultaneously rich in hydrophobic pollutants and surfactants. In this study we screened a natural surfactant-rich compartment, the sea surface microlayer, for surfactant-resistant bacteria, using enrichment cultures of sodium dodecyl sulfate (SDS) and cetyl trimethylammonium bromide (CTAB). A random set of isolates obtained from enrichment cultures were tested by PCR for the *Pseudomonas* genus marker *gacA* gene and for the *ndo* gene, encoding for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degrading enzyme naphthalene dioxygenase. Also, isolates were screened for biosurfactant production in solid medium. Results show a high relative abundance of surfactant resistant bacteria in the SML. *gacA* targeted PCR revealed that 44% of the surfactant-resistant isolates are Pseudomonads. However, PCR of *ndo* gene involved in PAH-degrading pathways was not successful with current primers. Biosurfactant production in solid medium was detected in 5 isolates, all belonging to the genus *Pseudomonas*. Sequencing of 16S rRNA revealed high phylogenetic similarity between the isolates obtained in this study and hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacteria from other natural environments.



# Índice

<i>Índice</i> .....	x
<i>Lista de Tabelas</i> .....	xiii
<i>Lista de Acrónimos e Abreviaturas</i> .....	xiv
<i>Introdução</i> .....	19
Biorremediação de poluentes hidrofóbicos.....	19
Surfactantes.....	21
Surfactantes e a biorremediação .....	22
Efeitos dos surfactantes nas bactérias.....	23
Mecanismos de resistência a surfactantes.....	24
Degradação de surfactantes .....	25
Biossurfactantes de origem microbiana .....	26
A microcamada superficial marinha enquanto habitat microbiano.....	27
Factores biológicos na SML.....	28
<i>Contextualização, objectivos e estratégia</i> .....	30
<i>Material e Métodos</i> .....	33
Caracterização do local de amostragem: Ria de Aveiro .....	33
Amostragem .....	34
Quantificação de bactérias resistentes a surfactantes .....	35
Isolamento de bactérias resistentes a surfactantes em culturas selectivas .....	35
Isolamento e purificação .....	36
Caracterização dos isolados bacterianos .....	36
Extracção de DNA.....	36
Detecção do gene <i>gacA</i> .....	37
Detecção do gene <i>ndo</i> .....	38
Tipagem genética.....	39
Sequenciação dos isolados.....	40
Produção de biossurfactantes.....	41
<i>Resultados</i> .....	45
Quantificação de bactérias resistentes a surfactantes .....	45
Isolamento de bactérias resistentes a surfactantes.....	45
Caracterização dos isolados bacterianos .....	46
Detecção do gene <i>ndo</i> (naftaleno dioxigenase) .....	46
Detecção do <i>gacA</i> .....	46
Produção de biossurfactantes .....	47
Tipagem genética.....	48

Sequenciação .....	48
<i>Discussão</i> .....	55
Tolerância do bacterioneuston a surfactantes .....	55
Isolados bacterianos resistentes a surfactantes .....	55
Produção de Biosurfactantes .....	56
Identificação e caracterização molecular dos isolados de bacterioneuston resistentes a surfactantes .....	58
O género <i>Pseudomonas</i> .....	58
Genes envolvidos na degradação do PAH naftaleno .....	59
Sequenciação e confirmação da identificação .....	59
<i>Conclusão</i> .....	65
<i>Bibliografia</i> .....	67

## Lista de Figuras

Figura 1 - Formação de micelas após a aplicação de surfactantes sobre uma camada de óleo.....	22
Figura 2 - Ria de Aveiro (Portugal) com indicação do local de amostragem A, junto ao Porto Comercial.....	33
Figura 3 - Método de amostragem do SML usando uma placa de vidro.....	34
Figura 4 - Fracção de bactérias resistentes a surfactantes: teor em meio selectivo / teor em meio não selectivo.....	45
Figura 5 - Exemplo de imagem do resultado de uma electroforese em gel de agarose do produto de amplificação do PCR para o gene <i>gacA</i> , marcador específico do género <i>Pseudomonas</i> , realizado num subconjunto de 10 isolados.....	46
Figura 6 - Proporção relativa do género <i>Pseudomonas</i> no subconjunto de 77 isolados bacterianos testados para o gene <i>gacA</i> .....	47
Figura 7 - A) Controlos positivos: SDS (10mM); CTAB (0.2mM); Tween 80 (0.008mM); Sufactina (0.0154mM); B) Controlo negativo: <i>Escherichia Coli</i> DH5 $\alpha$ ; C e D) Resultados positivos de produção de biossurfactantes.....	47
Figura 8 - Dendrograma com resultados da electroforese dos produtos de PCR com o primer BOX-A1R. Cada número corresponde a um isolado. O agrupamento dos números em caixa corresponde a um conjunto de isolados molecularmente idênticas, ou seja, clones.....	48

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Identidade dos isolados sujeitos a sequenciação de DNA e resultado do teste de produção de biosurfactante em meio sólido.....	49
Tabela 2 – Classificação dos resultados da sequenciação dos isolados através do RDP Classifier e comparação com a base de dados GenBank.....	50

## Lista de Acrónimos e Abreviaturas

µL	microlitro
µM	micromolar
Å	Ångström
atm	atmosfera
BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool”
BSA	Albumina sérica bovina
CMC	Concentração Micelar Crítica
CTAB	Brometo de cetil trimetilamónio,
cm	centimetro
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido tetraacético etilenodiamina
g	grama
km	kilometro
L	litro
LB	“Lysogeny Broth”
mL	mililitro
m	metro
mm	milimetro
mM	milimolar
MSB	Meio salino basal
M	Molar

ng	nanograma
nM	nanomolar
PAH	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
PY	Peptona-extracto de levedura
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
rpm	rotações por minuto
RDP	“Ribossomal Database Project”
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SML	Microcamada superficial marinha
Tween 80	Polioxietileno (20),4 sorbitan monoleato
U	Unidade de massa atómica
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
UV	Ultravioleta
UW	Águas subjacentes
V	Volt



# Introdução





## Introdução

O petróleo é a maior fonte de energia, para a sociedade moderna, e de matéria prima na produção de muitos produtos químicos, como plásticos, tintas e cosméticos. O transporte de petróleo é frequente, e as quantidades armazenadas nos países desenvolvidos são enormes. Conseqüentemente, o risco de derrames de petróleo no meio marinho é significativo. Anualmente, estima-se que 2 milhões de toneladas de petróleo são introduzidos, acidentalmente, no mar [1]. O derrame ocasional, em resultado de acidentes durante o transporte marítimo, nas plataformas petrolíferas, ou escoamento urbano sistemático, ocorre normalmente numa área restrita, afectando severamente a fauna e flora desse local [2].

Apesar dos esforços técnicos para reduzir o risco de derrame acidental de hidrocarbonetos petrolíferos, a extracção, processamento e transporte de hidrocarbonetos poluentes acarreta sempre riscos. É pertinente desenvolver mecanismos de limpeza após estes acidentes, de modo a reduzir os impactes negativos nos ecossistemas aquáticos. Várias estratégias de limpeza têm sido propostas nos últimos anos, envolvendo de métodos físicos, químicos e biológicos.

### *Biorremediação de poluentes hidrofóbicos*

O uso de microrganismos capazes de oxidar hidrocarbonetos, apresenta-se como uma estratégia bastante interessante, pois é menos agressiva nos efeitos colaterais sobre o ambiente e permite a remoção de petróleo disperso e em pequenas concentrações [3]. Contudo, apresenta a desvantagem de ser um processo lento, comparativamente aos processos físicos de eliminação do petróleo [4].

As bactérias são bons agentes de biodegradação em virtude da sua capacidade de usar uma enorme variedade de fontes de carbono e aceitadores de electrões que podem ser utilizadas pelos diferentes tipos fisiológicos [5]. Uma biorremediação eficiente requer microrganismos capazes de se adaptarem rapidamente ao poluente, e de o usar eficientemente num intervalo de tempo razoável [6].

As comunidades microbianas em ecossistemas contaminados tendem a ser dominados por organismos capazes de utilizar contaminantes tóxicos como fontes de carbono e/ou de sobreviver na sua presença. Estas comunidades são tipicamente menos diversificadas do que dos ecossistemas prístinos correspondentes. [7]. Em locais contaminados com hidrocarbonetos dominam as bactérias gram negativas, em particular do filo Proteobacteria, subclasses  $\alpha$ -proteobacteria e  $\gamma$ -proteobacteria

## Introdução

(géneros *Pseudomonas* e *Cycloclasticus*), e do filo *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides* [7-8].

Estratégias de biorremediação *in situ* podem envolver a estimulação de estirpes bacterianas naturais com nutrientes limitantes, tais como azoto e fósforo (bioestimulação) ou a introdução de microrganismos não nativos (bioaugmentação) [9]. A bioestimulação é considerada uma estratégia eficiente porque as bactérias indígenas estão melhor adaptadas ao ambiente do local [10]. Contudo a remediação total pode requerer mais tempo devido á escassez de micróbios autóctones e lentidão do crescimento populacional [10]. Por isso, a bioaugmentação é considerada uma estratégia mais promissora que a bioestimulação [10]. Todavia a bioaugmentação ainda é uma estratégia em fase experimental [11]. Apesar de registar alguns casos de sucessos, em muitos outros esta estratégia não conseguiu os efeitos desejados [11]. As principais causas do insucesso devem-se à inadaptação das estirpes introduzidas às condições ambientais [10-11]. Estirpes eficientes no local A revelam-se ineficiente no local B e estirpes mantidas e manipuladas geneticamente em laboratório acabam por ser ineficazes em condições *in situ* [10]. Para melhorar as acções de bioestimulação vários autores propõem a utilização de estirpes indígenas [10-11] e consórcios bacterianos [11-13].

A bioaugmentação mais eficiente é conseguida através da introdução de consórcios de estirpes bacterianas em vez de uma única estirpe [5, 14]. Estirpes únicas estão por vezes metabolicamente limitadas a uma estreita gama de substratos, enquanto um consórcio de diferentes espécies bacterianas pode apresentar capacidades enzimáticas mais alargadas e, conseqüentemente, potencial para degradar misturas complexas de poluentes, designadamente hidrocarbonetos [14]. Muitas vezes, uma única estirpe bacteriana é incapaz de assegurar o catabolismo completo de certos poluentes e os seus intermediários catabólicos, igualmente tóxicos, permanecem no ambiente [5]. Nestes casos, o catabolismo completo requer consórcios ou comunidades bacterianas de duas ou mais estirpes sintróficas [5]. As diferentes estirpes constituintes do consórcio vão desempenhar papéis diferentes no ecossistema microbiano influenciando-se mutuamente [5]. De igual modo, a cooperação de bactérias capazes de degradar, a matéria orgânica polimérica em monómeros facilmente assimiláveis através da produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, ou com capacidade para produzir biossurfactantes, que melhorem a dispersão e biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos, são um complemento muito vantajoso na degradação microbiana de hidrocarbonetos que pode ser aplicada na biorremediação *in situ*. [5]

## Introdução

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs – *polycyclic aromatic hydrocarbons*) são uma classe de compostos orgânicos hidrofóbicos constituídos por dois ou mais anéis benzénicos, arrançados segundo várias configurações[15]. São poluentes importantes do ar, solo e sistemas aquáticos, e derivam principalmente da combustão incompleta de materiais orgânicos [14]. Altas concentrações de PAHs são encontradas na microcamada superficial marinha (*SML – sea surface microlayer*) de zonas costeiras com intensas actividades antropogénicas, designadamente zonas portuárias e estaleiros navais[16]. Como os PAHs são também veiculados pelo ar, a sua concentração na SML é provavelmente maior do que na água subjacente (*UW – underlying water*) [17].

O destino dos PAHs na natureza é de grande preocupação ambiental devido aos seus efeitos tóxicos, mutagénicos e cancerígenos [18] e potencial de bioacumulação nas cadeias alimentares [14]. Por causa das suas propriedades químicas, os PAHs são de difícil degradação pelas bactérias e podem persistir no ambiente por muito tempo. PAHs de elevado peso molecular merecem particular atenção pois são menos reactivos, solúveis e voláteis, sendo conseqüentemente mais persistentes [6].

A degradação biológica de PAH ocorre preferencialmente sob condições aeróbias através da oxidação por dioxigenases e a subsequente quebra catabólica de um anel benzénico [18]. A maioria das bactérias com capacidade degradadora de PAH isoladas a partir de amostras ambientais pertence à subclasse das *γ-Proteobacteria* [19]. Este grupo inclui os géneros *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Pseudomonas*, *Oleiphilus*, *Oleispira* e *Thalassolituus* [8, 19]. A capacidade de degradação de PAH pelo género *Pseudomonas* encontra-se largamente descrita [15, 20] *Pseudomonas fluorescens* [21] e *Pseudomonas putida* [22] são algumas das espécies deste género cuja capacidade de degradação de PAH está documentada [21-22]. Neste género, os genes responsáveis pela degradação de PAH encontram-se mais frequentemente em plasmídeos [22].

Os PAHs apresentam baixa solubilidade em água e tendem a adsorver à matéria orgânica dos solos e sedimentos, o que limita a sua biodisponibilidade [18]. A aplicação de surfactantes e solventes orgânicos é muitas vezes necessária para tornar os PAHs mais biodisponíveis ou desadsorve-los dos sedimentos [18].

## Surfactantes

Os surfactantes são um grupo diversificado de químicos economicamente importantes devido às suas propriedades tensioactivas. Eles fazem parte de inúmeros

## Introdução

produtos domésticos, designadamente detergentes, e são usados intensivamente em diversas indústrias. A produção mundial de surfactantes sintéticos ronda as 7,2 milhões de toneladas anuais [23].

O termo surfactante (*surfactant*) provem do inglês “**surface active agent**” e é a designação dada a qualquer composto capaz de reduzir a tensão interfacial entre dois fluidos ou entre um fluido e uma superfície sólida quando aplicado em baixas concentrações [24]. Os surfactantes apresentam natureza anfipática (uma zona hidrofílica e uma zona hidrofóbica) e podem ser de origem sintética ou biológica (biosurfactantes).

A partir de determinada concentração, definida como concentração micelar crítica (CMC), ocorre a formação de micelas [25], estruturas esféricas em que a parte hidrofóbica do surfactante se encontra orientada para o centro englobando a fase hidrofóbica da mistura (i.e. poluente hidrofóbico no seu interior, permitindo assim que o composto hidrofóbico se disperse na fase aquosa [26] (Figura 1). Quanto mais baixa a CMC de um surfactante, maior será a sua capacidade de solubilizar compostos hidrofóbicos em meio aquoso [25].

Os surfactantes são classificados, quanto à carga iónica que apresentam na parte hidrofílica da molécula, em aniónicos (carga iónica negativa), catiónicos (carga iónica positiva), não iónicos (sem carga iónica) ou anfotéricos (duas cargas iónicas opostas) [25]. A carga iónica é uma característica relevante do surfactante aquando da sua interacção com os microrganismos [27].

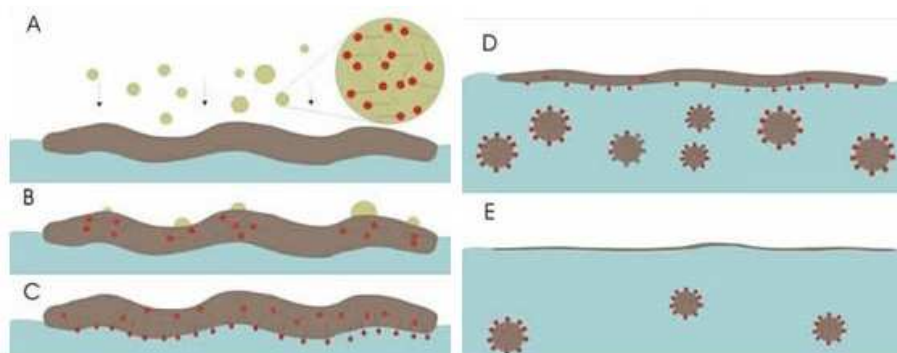


Figura 1 - Formação de micelas após a aplicação de surfactantes sobre uma camada de óleo.

## Surfactantes e a biorremediação

A solubilização dos compostos hidrofóbicos em meio aquoso e o seu transporte para o interior das células bacterianas capazes de os metabolizar apresentam-se como passos limitantes no processo de biodegradação [4]. Um possível modo de aumentar a biodisponibilidade destes contaminantes é a através da aplicação de surfactantes, cujas propriedades anfipáticas lhes conferem a capacidade de reduzir a

## *Introdução*

tensão interfacial e, acima da CMC, formar microemulsões, nas quais os hidrocarbonetos se solubilizam em meio aquoso [1, 9] (Figura 1).

Contudo, os resultados de testes de biodegradação com adição de surfactantes mostram-se contraditórios [1]. Enquanto alguns estudos reportam o aumento da taxa de mineralização do poluente devido à adição do surfactante [26, 28-35], outros mostram inibição da taxa de mineralização do poluente [14, 31, 36-44]. A razão da incerteza ou mesmo insucesso da aplicação do surfactante no aumento da eficiência da biorremediação deve-se essencialmente à toxicidade do surfactante [45]. O efeito tóxico da adição de surfactantes depende das propriedades químicas do composto, das estirpes microbianas envolvidas na degradação do poluente e de factores ambientais [25].

## *Efeitos dos surfactantes nas bactérias*

A membrana celular é o principal alvo da acção tóxica dos surfactantes [27]. De um modo geral, os principais efeitos tóxicos dos surfactantes sintéticos nas membranas celulares dos microrganismos são o aumento da fluidez membranar, alterações físicas na estrutura da membrana e inactivação das proteínas membranares, o que interfere com a produção de ATP [25, 27]. Até recentemente, considerava-se que o aumento da fluidez das membranas era a principal causa de morte celular causada pelos surfactantes nos microrganismos. Todavia, os surfactantes que induziam maior fluidez não são os mais inibidores do crescimento bacteriano [27]. O aumento da fluidez membranar não leva à morte celular, mas conduz ao aumento da permeabilidade e, associado à perda da função da membrana, particularmente a inactivação das proteínas membranares, induzirá para a lise celular nos microrganismos [25, 27].

A carga da molécula tem grande importância na toxicidade do surfactante sobre os microrganismos [25]. De um modo geral, surfactantes anfotéricos e catiónicos são considerados os mais tóxicos e são usados frequentemente como agentes bactericidas [25]. Uma vez que apresentam cargas positivas, têm grande afinidade com a membrana celular dos microrganismos carregada negativamente [46]. Deste modo adsorvem à superfície celular através de ligações iónicas [47] e alteram a permeabilidade membranar levando à morte celular [48]. Os surfactantes anfotéricos apresentam propriedades bactericidas similares aos surfactantes catiónicos, contudo as suas propriedades são mantidas num espectro maior de pH e a inactivação pelas proteínas é mais difícil [27]. Os surfactantes catiónicos exibem normalmente maior toxicidade para as bactérias gram negativas do que para as bactérias gram positivas

## Introdução

[49]. Os principais efeitos dos surfactantes catiónicos são a disrupção da membrana celular [50], a alteração na conformação das proteínas e consequente disfunção [51], a libertação intracelular de  $K^+$  [52] e a indução da lise celular [53]. Em *Pseudomonas aeruginosa* foi detectada inibição da actividade respiratória [51].

Os surfactantes aniónicos são menos tóxicos e os não-iónicos apresentam uma toxicidade relativamente baixa, sendo normalmente considerados não tóxicos [25]. Os surfactantes aniónicos quando usados em elevadas concentrações também induzem a lise celular e apresentam maior impacto nas bactérias gram positivas do que nas gram negativas [25, 54]. Os surfactantes aniónicos ligam-se a várias macromoléculas biológicas, nomeadamente amido [55], péptidos e proteínas [56], DNA [57] e enzimas [58], e também a estruturas celulares como a membrana citoplasmática, inibindo a sua função biológica [59].

## Mecanismos de resistência a surfactantes

A resistência intrínseca ao surfactante ou biosurfactante depende da permeabilidade da parede celular e membrana externa das bactérias gram negativas, da capacidade metabólica de degradar o surfactante e da capacidade de efluxo [25, 60]. A resistência bacteriana a surfactantes tem sido largamente estudada, particularmente no contexto da microbiologia clínica [61-62]. Os resultados de diversas experiências revelam um aumento das componentes membranares tais como fosfolípidos, ácidos gordos e outros lípidos em estirpes resistentes, que, provavelmente suprimem a adsorção dos surfactantes às células [52, 62]. Alterações na parede celular, membrana externa e hidrofobicidade da superfície celular também estão evidenciadas em bactérias resistentes a surfactantes catiónicos [60]. Alternativamente, o efluxo activo de surfactante que pode estar codificado em plasmídeos, confere também um aumento da resistência a surfactantes [49, 63-64].

Estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a surfactantes catiónicos apresentam expressão aumentada para a proteína OprR da membrana externa [60]. A função desta proteína não é conhecida, embora tenham sido sugeridas como hipóteses a contribuição da OprR para o aumento da resistência mecânica da membrana externa e diminuição da sua permeabilidade ou a associação da OprR em canais que aumentam o efluxo de surfactante [60].

Bactérias produtoras de biosurfactantes são positivamente seleccionadas em culturas de enriquecimento adicionadas de surfactante [9], verificando-se que a

## Introdução

produção de biossurfactantes confere à resistência a surfactantes sintéticos, apesar de, provavelmente, esta não ser esta a sua função principal [65].

## Degradação de surfactantes

A degradação de surfactantes sintéticos é frequente em bactérias que conseguem crescer na sua presença [66-67]. Esta capacidade é um modo de adaptação das bactérias a ambientes ricos em surfactantes [68] e conseqüentemente confere-lhes resistência a determinados surfactantes [69]. A degradabilidade do surfactante é influenciada pelas propriedades da própria molécula (carga eléctrica e complexidade da estrutura), capacidade degradativa do microrganismo e condições ambientais [69]. Surfactantes aniónicos, como o dodecil sulfato de sódio (SDS), são facilmente degradado por microrganismos [17, 66, 69] em virtude da sua estrutura simples e linear, baixa massa molecular e elevada solubilidade em água [17]. O SDS é, historicamente, um surfactante de uso generalizado e prolongado, pelo que sua presença no ambiente é elevada, o que provavelmente terá contribuído para à adaptação das bactérias heterotróficas [17]. Apesar de não serem tão facilmente degradados quanto os surfactantes aniónicos [69] a biodegradação microbiana de surfactantes catiónicos [67, 70-71] e não-iónicos [69, 72] encontra-se igualmente referenciada. A degradabilidade dos surfactantes não-iónicos depende da complexidade estrutural da sua molécula e a degradabilidade dos surfactantes catiónicos varia com o surfactante e com a estirpe bacteriana [23]. Atendendo à sua natureza anfipática, os surfactantes vão acumular-se tendencialmente em interfaces como a SML [73] e as comunidades de bacterioneuston poderão desempenhar um papel importante na degradação destes compostos [17].

Os únicos organismos capazes de degradar surfactantes são as bactérias [17]. Entre os géneros bacterianos degradadores de surfactantes descritos até ao momento incluem-se *Bacillus* [17, 74], *Flavobacterium*, *Achromobater*, [17], *Pseudomonas* [66, 74-75], *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* [74] e a espécie *Acinetobacter johnsoni* [75]. O género *Pseudomonas* é um dos mais reconhecidos degradadores de surfactantes. A actividade de alquilsulfatases, envolvidas neste processo, já foi referenciada em várias estirpes de *Pseudomonas* (*P.C12B*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. sp. AE-A*, *P. sp. AE-D*) [66].



### *Biossurfactantes de origem microbiana*

A produção de biossurfactantes é o mecanismo mais comum pelo qual os microrganismos sobrevivem em interfaces ambientais [25]. Os biossurfactantes são um conjunto de moléculas, estrutural e funcionalmente diversas [65], com propriedades tensoactivas, sintetizados por microrganismos. São compostos biológicos anfipáticos, produzidos extracelularmente ou como constituintes da membrana, por certos tipos de bactérias, leveduras e fungos filamentosos durante o crescimento a partir de fontes de carbono, mas em particular em substratos hidrofóbicos, como os hidrocarbonetos [76-77]. Os substratos mais utilizados para a produção de biossurfactantes *in vitro* são os hidrocarbonetos [78], mas outros substratos como os hidratos de carbono e óleos vegetais encontra-se referenciado [76].

A diversidade de biossurfactantes reflecte a diversidade de funções, que desempenham nos ambientes naturais [65]. Frequentemente, estes compostos conferem aos organismos produtores adaptações a determinados micro-nichos ecológicos, como biofilmes ou substratos hidrofóbicos, tornando-os mais competitivos em relação à restante comunidade microbiana [65].

O crescimento de certas espécies bacterianas capaz de usar hidrocarbonetos como fonte de energia e carbono envolve, normalmente, a produção de biossurfactantes [77]. Bactérias produtoras de biossurfactantes foram isoladas de locais contaminados com petróleo e seus derivados [79]. Nalguns casos a produção de biossurfactantes é necessária para as bactérias usarem compostos hidrofóbicos como substratos [77]. Mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* PG201, incapazes de produzir ramnolípidos, um biossurfactante característico deste género, foram incapazes de crescer em meio mínimo com hexadecano. Só após a adição exógena de ramnolípidos, os mutantes crescem e assimilam o hidrocarboneto fornecido [77].

Outros efeitos dos biossurfactantes incluem a quelação de metais pesados, inibição da actividade microbiana, regulação dos mecanismos de adesão às superfícies, regulação de respostas *quorum sensing* e formação e estabilização de biofilmes, podendo ainda estar envolvidos no desenvolvimento de doenças em plantas [65].

Actualmente, os surfactantes sintéticos petroquímicos e oleoquímicos representam a maior parte dos surfactantes de uso doméstico e industrial [76, 80]. Contudo, o seu modo de produção e os produtos secundários gerados são normalmente nocivos para o ambiente [76]. Em alguns casos, são dificilmente degradados ou mesmo não-biodegradáveis, podendo bioacumular-se na cadeia

## Introdução

trófica [76]. Além disso, como grande parte é obtida a partir do petróleo (50%) [80], a sua produção industrial contribui para o aumento de gases de estufa e o consequente aquecimento global [80]. Devido ao rigor da regulação legal e à maior sensibilização ambiental, os biossurfactantes microbianos começam a suscitar crescente interesse como potenciais alternativas aos surfactantes sintéticos [76]. Além de serem ambientalmente menos agressivos, os biossurfactantes possuem certas vantagens técnicas comparativamente aos seus homólogos sintéticos: são biologicamente benignos (útil em aplicações farmacêuticas, cosméticas e alimentares), são mais específicos em relação ao substrato e são mais eficientes em valores de temperatura, salinidade e pH biologicamente extremos [9, 76].

Actualmente, os biossurfactantes estão a ser testados na recuperação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos [81]. Os biossurfactantes têm também aplicação como aditivos alimentares (emulsionificadores), herbicidas e pesticidas para a agricultura, bem como componentes em produtos de cosmética, farmacologia e enzimologia aplicada [82]. Todavia, os biossurfactantes apresentam também algumas desvantagens técnicas que limitam a sua introdução massiva no mercado. A produção industrial é dispendiosa, podendo no entanto tornar-se mais acessível com recurso a substratos menos dispendiosos, e há ainda dificuldades em melhorar o rendimento dos processos de produção e de purificação [76]. A produção eficiente e barata de biossurfactantes necessita ainda de um trabalho de prospecção biológica e de estudos aprofundados da genética e fisiologia dos organismos produtores [76].

### *A microcamada superficial marinha enquanto habitat microbiano*

A microcamada superficial marinha (SML - *surface marine microlayer*) é descrita como milímetro superior da coluna de água [83]. A SML está em contacto com e é influenciada pela água subjacente (UW – *underlying water*) e pela atmosfera [84]. A sua espessura varia conforme os autores e o tipo de estudo. Actualmente, e com base em toda a literatura existente, Wurl & Obbard 2004 [16] propõem que uma espessura de amostragem de aproximadamente 60 µm é a mais adequada ao estudo das propriedades físico-químicas da SML e uma espessura até 1000 µm para o estudo das propriedades biológicas [16].

A SML forma um ambiente único caracterizado por propriedades físicas, químicas e biológicas diferentes da UW [84-85]. A SML está exposta a condições ambientais biologicamente extremas, nomeadamente, elevada incidência de radiações solares (em particular UV) e amplas flutuações de temperatura e salinidade [83].

## *Introdução*

A formação da SML resulta da acumulação na interface de substâncias químicas provenientes da atmosfera e hidrosfera, formando um filme ou biofilme superficial [17]. A SML é rica em proteínas, polissacárideos, ácidos húmicos, lípidos e surfactantes. A SML concentra ainda poluentes, designadamente hidrocarbonetos clorinados, compostos organometálicos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) [16]. Estes podem na SML, em concentrações até 500 vezes mais elevadas do que nas águas subadjacentes [16]. A deposição atmosférica desempenha um papel significativo na composição química da SML [17, 84]. A SML apresenta maior acumulação de poluentes em áreas industriais e urbanas, devido ao gases emitidos e efluentes, e em portos, baías semi-fechadas e estuários devido ao baixo hidrodinamismo [16].

A SML é um ambiente fisicamente estável [86]. A estabilidade física da SML resulta das forças de tensão superficial decorrentes da acumulação de compostos orgânicos, em particular os lípidos e os surfactantes [17, 73, 87]. Eles encontram-se à superfície constituindo a camada multimolecular (100Å), enquanto os restantes compostos hidrossolúveis se localizam abaixo desta [88]. Estuários e sistemas aquáticos semi-fechados providenciam condições ideais para a formação da SML mais densas do que águas costeiras e oceânicas [89].

## *Factores biológicos na SML*

A SML é um ecossistema biologicamente rico, onde se encontram ovos e formas larvares de insectos e organismos marinhos (peixes e invertebrados), alguns com importância económica [16]. Os organismos residentes na SML são denominados de neuston. O neuston inclui o virioneuston, o bacterioneuston, o fitoneuston, o zooneuston e o ictioneuston [90]. A SML encontra-se significativamente enriquecida em procariontes heterotróficos, protistas heterotróficos, pico- e nanoeucariotas [90]. Comparativamente às águas subjacentes, a abundância de bactérias, microalgas e invertebrados encontra-se aumentada na SML  $10^2$ - $10^4$ ,  $1$ - $10^2$  e  $1$ - $10$  vezes, respectivamente [16].

O bacterioneuston está simultaneamente exposto a condições vantajosas e desvantajosas [86]. A elevada disponibilidade de matéria orgânica e nutrientes inorgânica [90-91] favorece o crescimento e desenvolvimento das comunidades heterotróficas [92]. Outras condições, como as elevadas concentrações de metais pesados e poluentes [16, 93] e a elevada exposição à radiação ultravioleta [91] são desfavoráveis. De modo a sobreviver sob estas condições extremas da SML, o bacterioneuston pode ter desenvolvido adaptações específicas [84]. Os

## *Introdução*

microrganismos que conseguem resistir nas condições adversas da SML têm ao seu dispor uma elevada concentração de matéria orgânica e nutrientes inorgânicos ainda que muitos de natureza mais hidrofóbica do que nas águas subjacentes [17]. Todavia, a estrutura das comunidades de bacterioneuston está ainda escassamente caracterizada. Pode, por isso, representar uma fonte de microrganismos novos e potencialmente interessantes do ponto de vista biotecnológico [84]. Devido à acumulação de poluentes hidrofóbicos, o bacterioneuston é uma potencial fonte de estirpes bacterianas com potencial para a aplicação em estratégias de biorremediação.

## Contextualização, objectivos e estratégia

As estratégias de biorremediação de derrames de petróleo envolvem frequentemente a aplicação de surfactantes de modo a aumentar a solubilidade e biodisponibilidade dos poluentes hidrofóbicos na água e consequentemente acelerar a taxa natural de mineralização do poluente pelos microrganismos indígenas. Todavia os surfactantes, devido às suas propriedades tensioactivas, podem afectar negativamente os microrganismos, inibido o crescimento de comunidades bacterianas degradadoras e desacelerando a taxa natural de mineralização. O uso de microrganismos degradadores dos poluentes com resistência a elevadas concentrações de surfactantes é uma perspectiva biotecnológica interessante que pode ser aproveitada em estratégias de bioaugmentação. Neste contexto, a SML apresenta-se como um compartimento natural com potencial biotecnológico, pois é um ambiente simultaneamente rico em poluentes orgânicos e surfactantes. A comunidade bacteriana da SML, (bacterioneuston) poderá estar seleccionada positivamente no ambiente natural para resistir a surfactantes e degradar poluentes hidrofóbicos. Complementarmente, a produção de biosurfactantes de origem bacteriana, pode ser uma estratégia adaptativa usada pelo bacterioneuston para sobreviver no ambiente interfacial, tolerar os efeitos tensioactivos dos surfactantes químicos e aumentar a biodisponibilidade de poluentes hidrofóbicos.

Com este trabalho pretende-se efectuar um estudo exploratório sobre a resistência do bacterioneuston a surfactantes sintéticos e, paralelamente, do seu potencial para produzir biosurfactantes e contribuir para a aceleração da degradação de poluentes hidrofóbicos em meio marinho. A partir dum meio selectivo, pretendeu-se cultivar e isolar bactérias resistentes a surfactantes adicionados ao meio de cultura em concentrações acima da CMC (*concentração micelar crítica*). Os isolados obtidos foram testados quanto à produção de biosurfactantes por métodos dependentes do cultivo. Identificação dos isolados foi dirigida ao género *Pseudomonas*, considerado relevante numa perspectiva de capacidade degradativa. A presença do gene marcador de espécies do género *Pseudomonas* foram analisados com recurso a ferramentas de biologia molecular. Posteriormente, procedeu-se à detecção por PCR da presença de genes relacionados com a degradação de PAH., ,.

## Material e Métodos



## Material e Métodos

### *Caracterização do local de amostragem: Ria de Aveiro*

A Ria de Aveiro é uma lagoa costeira de baixa profundidade localizada na costa atlântica, noroeste de Portugal [94]. Também é considerada um estuário uma vez que ocorre diluição da água salgada pela água doce transportada pelos rios. Apresenta uma topografia irregular, com vários canais a divergirem de uma única abertura estreita para o oceano. Os quatro canais principais são o canal de Mira, o canal de Ílhavo, o canal do Espinheiro e o canal de S. Jacinto. O canal de Ílhavo é o mais estreito e curto, com uma extensão de 15 km [95].

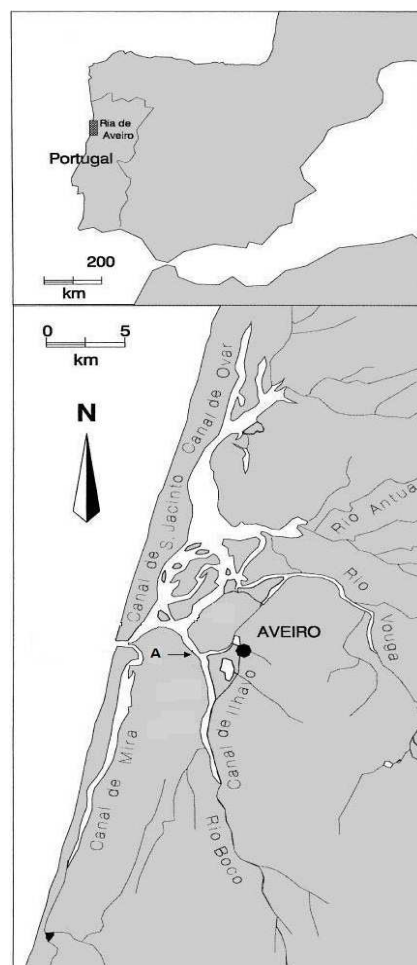


Figura 2 - Ria de Aveiro (Portugal) com indicação do local de amostragem A, junto ao Porto Comercial.

A profundidade média é de 1 m, nos canais de navegação e na ligação ao oceano a profundidade é de aproximadamente 7 e 20 m, respectivamente [95]. A área coberta varia entre 83 km<sup>2</sup> em praia mar 66 km<sup>2</sup> em baixa-mar [95]. A diferença de



salinidade entre a superfície e o fundo da coluna de água é muito baixa, podendo a Ria de Aveiro ser descrita como verticalmente homogênea [96].

A Ria de Aveiro proporciona condições diversas para actividades humanas, designadamente portuárias e recreativas, sendo também um local de descarga de resíduos industriais e domésticos. Oferece boas condições para o desenvolvimento de actividades ligadas à aquacultura e agricultura, tendo-se desenvolvido várias indústrias de pequenas e médias dimensões nas suas margens [97]. Todas estas actividades são fontes de contaminação, que têm como consequência a eutrofização significativa deste sistema [98]. A amostra de SML foi recolhida no canal de Ílhavo no dia 14 de Novembro de 2008, no local A (Latitude N 40° 38'20, Longitude W 08°41'32) (Figura 2). Esta estação situa-se próximas de um porto comercial e zonas urbanas.

### *Amostragem*

O protocolo de recolha, assim como o desenho do amostrador, foram adaptados de Agogué et al 2004 (Figura 3) [83]. As amostras da SML foram recolhidas utilizando uma placa de vidro e uma placa de acrílico (33 cm x 20 cm x 3 mm), considerando que devido às diferentes afinidades destes dois materiais relativamente aos constituintes químicos da amostra, a utilização combinada dos dois permite obter uma amostra mais representativa. Antes de cada amostragem, as placas foram limpas com álcool etílico e água destilada esterilizada.

As placas foram mergulhadas na posição vertical, retiradas e deixadas a escorrer em posição vertical durante aproximadamente cinco segundos para rejeitar o excesso de água. A SML propriamente dita foi recolhida para um frasco esterilizado, forçando as placas através das lâminas de borracha do amostrador (Figura 3) Este procedimento foi repetido, alternando entre a placa de vidro e a placa de acrílico, até se conseguir o volume necessário de amostra composta.

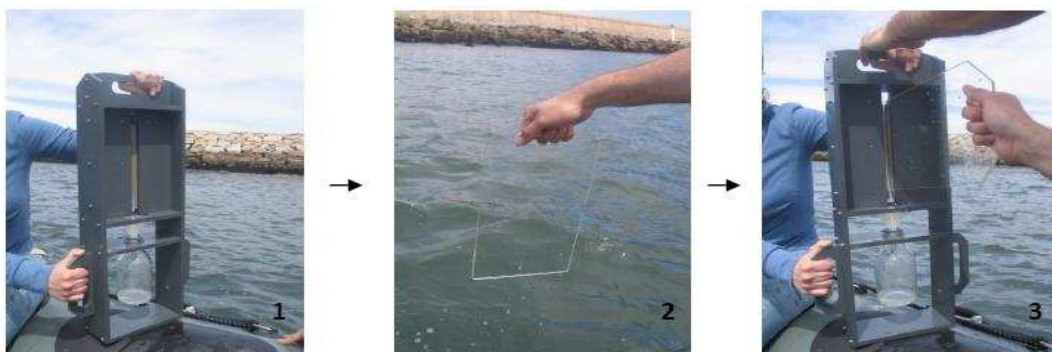


Figura 3 - Método de amostragem do SML usando uma placa de vidro.

### *Quantificação de bactérias resistentes a surfactantes*

De modo a quantificar as bactérias resistentes a surfactante da SML, procedeu-se à diluição decimal da amostra em água Milli Q. Alíquotas das diluições  $10^0$ ,  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ; foram semeadas à superfície em meio sólido PY (0.1% extracto de levedura, 0.01% peptona, 1,5% agar; água estuarina estéril – salinidade  $17 \text{ gL}^{-1}$ ) [9] contendo 70 mM de SDS (dodecil sulfato de sódio, BioRad) ou 1 mM de CTAB (Brometo de cetil trimetilamónio, Sigma-Aldrich) (meio selectivo). Foram semeadas três réplicas de cada diluição. Procedeu-se de forma idêntica, à sementeira em meio PY sem surfactante (controle). As placas inoculadas foram incubadas à temperatura ambiente (aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ ) no escuro, durante aproximadamente 72 h. Após este período, procedeu-se à contagem das unidades formadoras de colónias (UFCs) na diluição mais conveniente tanto nos meios adicionados como no controle. O teor de  $\text{UFCmL}^{-1}$  foi calculado a partir da média das réplicas, corrigida para o factor de diluição.

Diferenças entre resultados obtidos entre SDS e CTAB foram analisadas quanto à normalidade da distribuição (teste Kolmogorov-Smirnov) e à homogeneidade de variâncias (método de Levene). Confirmados estes pressupostos procedeu-se à análise paramétrica das variâncias. O programa de análise estatística utilizado foi o SPSS 15.0.

### *Isolamento de bactérias resistentes a surfactantes em culturas selectivas*

No dia da recolha das amostras, foram preparadas duas culturas selectivas adicionando 200 mL de amostra e 800 mL de meio salino basal (MSB) ( $\text{NaCl } 0.5 \text{ gL}^{-1}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4 3.5 \text{ gL}^{-1}$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl } 0.5 \text{ gL}^{-1}$ ;  $\text{NaSO}_4 0.14 \text{ gL}^{-1}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 1.5 \text{ gL}^{-1}$ ;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O } 0.15 \text{ gL}^{-1}$  em água estuarina –  $17 \text{ gL}^{-1}$ ; pH 7.1) [75]. Como fonte única de carbono, adicionou-se (8mM de SDS a uma das culturas e 1 mM de CTAB a outra. Os *erlenmeyers* contendo as culturas foram tapados com uma rolha de algodão permeável ao ar e foram envolvidos em plástico preto de modo a protegê-los da luz. As culturas selectivas foram incubadas à temperatura ambiente (aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ ) durante 8 semanas, numa plataforma de agitação (120 rpm). Na segunda e quarta semana de incubação, procedeu-se à renovação de meio. A um *erlenmeyer* 800 mL de MSB em concentração idêntica à inicial, adicionou-se 200 mL da cultura selectiva anterior.

Semanalmente procedeu-se à recolha de alíquotas de cada uma das culturas selectivas, que foram seguidamente diluídas em água Milli-Q e semeadas à superfície

## *Material e Métodos*

em meio PY sólido adicionado do respectivo surfactante (70 mM SDS, BioRad ou 1mM CTAB, Sigma-Aldrich). As placas de isolamento foram incubadas 72 h no escuro à temperatura de 25°C.

### *Isolamento e purificação*

A partir das placas de isolamento adicionadas de cada um dos dois tipos de surfactante, foram seleccionadas visualmente, colónias representativas das várias morfologias. Para purificação dos isolados, as colónias foram repicadas pelo menos 3 vezes, para novas placas de meio sólido (PY mais surfactante).

Posteriormente procedeu-se à preparação de culturas puras para preservação dos isolados com vista ao seu estudo subsequente. Com a um palito estéril, repicou-se uma colónia isolada para 1 mL de meio PY líquido (1% peptona, 0.5% extracto de levedura, em água estuarina – 17 gL<sup>-1</sup>). Incubou-se à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) numa placa de agitação a 120 rpm durante 12 h. Às culturas obtidas, adicionou-se 100 µL de glicerol a 30%. As culturas foram colocadas durante 1 hora a -80°C de modo a conseguir um congelamento rápido e evitar a cristalização do glicerol. Posteriormente foram transferidas para uma arca a -20°C onde se conservaram durante o estudo.

### *Caracterização dos isolados bacterianos*

#### **Extracção de DNA**

A extracção de DNA total dos isolados bacterianos foi realizada seguindo uma adaptação do procedimento descrito por Henriques *et al* 2004 [98]. O DNA foi extraído num subconjunto de 77 isolados para posterior caracterização molecular. A partir das culturas em meio PY sólido, recolheu-se com um palito estéril uma colónia isolada e ressuspendeu-se em meio PY líquido. As culturas foram deixadas a crescer *overnight* à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), numa placa de agitação a 120 rpm. As culturas densas foram centrifugadas durante 5 min a 13000 rpm de modo a sedimentar as células. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 50 µL de TE (10 mM Tris-HCl, Fluka; 1 mM EDTA, Fluka; pH 8.0). De seguida, adicionou-se 50µL de solução de lisozima (30 mgmL<sup>-1</sup>) e incubou-se a 37°C durante 1h. Após a incubação adicionou-se 50 µL de solução de lise (Kit de extracção de DNA; Genomic DNA purification Kit, Fermentas) e incubou-se 10 minutos a 65°C.

## Material e Métodos

Seguidamente adicionou-se 20 µL de SDS 25% (BioRad) e incubou-se durante 10 min a 68°C. Depois adicionou-se 50 µL de NaCl 5mM e agitou-se no vórtex à velocidade máxima durante 1 min. Após uma incubação de 5 min a 68°C, agitou-se novamente no vórtex. De seguida, adicionou-se 100 µL de clorofórmio e agitou-se suavemente o microtubo contendo a amostra. Após uma centrifugação de 5 min a 13000 rpm, removeu-se cuidadosamente a fase aquosa para um novo microtubo de 1.5 mL e descartou-se o restante. Adicionou-se 100 µL de isopropanol e misturou-se por inversão. Centrifugou-se à velocidade máxima durante 5 min, adicionou-se 100 µL de etanol absoluto frio, misturando bem por inversão, e colocou-se as amostras a -4°C durante 15 min. Posteriormente centrifugou-se a amostra à velocidade máxima durante 5 min de modo a sedimentar o DNA-RNA extraído e levou-se o sedimento com etanol a 70%. Por fim, centrifugou-se novamente à velocidade máxima durante 3 min, descartando cuidadosamente o sobrenadante. O sedimento foi dissolvido em 50 µL de TE.

Para avaliar o sucesso da extração de DNA, 5 µL de amostra foram sujeitos a uma electroforese em gel de agarose 1.5% (Fluka), com brometo de etídio (VWR) a 80V durante aproximadamente 30 min em tampão TAE (0.04M Tris-Acetato - Fluka, 0.001M EDTA - Fluka, pH 8.0). A existência de bandas, indicativas da presença de DNA foi analisada visualmente, colocando o gel num transiluminador de UV (Benchtop UV). As amostras de DNA foram conservadas a -20 °C.

### Detecção do gene *gacA*

O gene *gacA* está envolvido na biossíntese de metabolitos secundários e na produção de enzimas extracelulares em espécies do género *Pseudomonas*, podendo ser utilizado como um marcador genético para este género em amostras ambientais [99]. A detecção do gene *gacA* foi tentada no conjunto de 77 isolados cujo DNA foi anteriormente extraído. Este gene *gacA* foi amplificado com os *primers* GACA-1F (5'-TGATTAGGGTGYTAGTDGTCGA-3') e GACA-2 (5'-MGYCARYTCVACRTC RCTGSTGAT-3') [99] (IBA GmbH. As amplificações foram realizadas em misturas reaccionais de 25 µL que continham 1 µL de amostra, 1 U de Taq polimerase, tampão KCl 1x, 0.2 mM de dNTPs, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.75 µM de primer, 0.25 mg de BSA (Albumina sérica bovina, Sigma), 5% DMSO (Dimetilsulfóxido, Panreac) e água desionizada esterilizada. As condições de reacção foram as seguintes: um passo de desnaturação inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 34 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 min, *anelamento* a 57°C durante 1 min e extensão a 72°C durante 1

min. A reacção de PCR foi concluída com um passo de extensão final de 72°C durante 4 min.

### Detecção do gene *ndo*

Para o estudo da ocorrência e diversidade de genes de dioxigenases foram testados dois protocolos de PCR distintos. Inicialmente aplicou-se um protocolo específico para a subunidade  $\alpha$  das dioxigenases [100] num subconjunto de 12 isolados, mas posteriormente, considerando a elevada representação do género *Pseudomonas* na SML [9] e no conjunto de isolados tolerantes a surfactantes, bem como a maior resistência das bactérias Gram-negativas a surfactantes [25], utilizou-se um protocolo específico para dioxigenases de bactérias Gram-negativas [101]. Este segundo protocolo foi também aplicado aos 77 isolados cujo DNA tinha sido anteriormente extraído. Para primeira abordagem, foram utilizados os *primers* NAPH-1F (5'-TGGCTTTTCYTSACBCATG-3') e NAPH-1R (5'-DGRCATSTCTTTTTCBAC-3') (IBA GmbH, Alemanha) específicos para a subunidade  $\alpha$  das dioxigenases [101]. As amplificações foram realizadas em misturas reaccionais de 25  $\mu$ L que continham 1  $\mu$ L de amostra, 1 U de Taq polimerase, tampão KCl 1x, 0.2 mM de dNTPs, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ M de *primer*, 4% DMSO (Panreac) e água desionizada esterilizada. As condições de PCR foram as seguintes: um passo de desnaturação inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 34 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1 min, *anelamento* a 51°C durante 1 min e 30s e extensão a 72°C durante 2 min. A reacção de PCR foi concluída com um passo de extensão final de 72°C durante 10 min. Para a segunda abordagem, utilizou-se os *primers* PAH-RHD $\alpha$  GNF (GAGATGCATACCACGTKGGTTGGA) e PAH-RHD $\alpha$  GNR (AGCTGTTGTTCGGGAAGAYWGTGCMGTT) específicos para dioxigenases de bactérias Gram-negativas [101] (IBA GmbH, Alemanha). As reacções de PCR foram realizadas em misturas reaccionais de 25  $\mu$ L que continham 1  $\mu$ L de produto de amplificação do primeiro PCR, 1 U de Taq polimerase, tampão KCl 1x, 0.2 mM de dNTPs, 3.75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1  $\mu$ M de *primer* e água desionizada esterilizada. As condições de PCR foram as seguintes: um passo de desnaturação inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 45 s, *anelamento* a 57°C durante 45 s e extensão a 72°C durante 45 s. A reacção de PCR foi concluída com um passo de extensão final de 72°C durante 7 min.

Numa fase posterior, e face ao insucesso das amplificações com os *primers* anteriormente referidos, testou-se um novo conjunto de *primers* mais abrangente para

o gene *ndo* [102]. Nesta última abordagem, foram usados os *primers* BPHD-f3 (5'-GCCTCCTCGCCCATCAG-3') e BPHD-r1 (5'-GCCTTGCCAGCCCGCTCAG-3') (IBA GmbH, Alemanha) [102]. As reacções de PCR foram realizadas em 25 µL com 1 U de Taq polimerase Master Mix (com 4 mM MgCl<sub>2</sub>), 0.1µM de cada primer, 150 ngµL<sup>-1</sup> de BSA (*Bovine serum albumine*; Sigma) e 4 ng de DNA molde. As condições de PCR foram as seguintes: um passo de desnaturação inicial a 95°C durante 3 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C durante 45 s, *anelamento* a 60°C durante 45 s e extensão a 72°C durante 40 s. A reacção de PCR foi concluída com um passo de extensão final de 72°C durante 4 min [102].

Todas as reacções de PCR foram efectuadas num termociclador Multigene TC 9600 – G (*Labnet International, Inc*) ou num termociclador MyCycler Personal Thermal Cycler (BioRad), com reagentes da MBI Fermentas (Vilnius, Lituânia), excepto quando na descrição do método foi referido um fabricante diferente.

A presença de produtos de amplificação foi confirmada por electroforese em gel de agarose 1.5% (Fluka), com brometo de etídio (VWR), a 100 V durante aproximadamente 20 min em tampão TAE 1x (0.04M Tris-Acetato, Sigma, 0.001M EDTA, Sigma; pH 8.0). Como controle positivo foi usado DNA extraído de uma cultura pura sequenciada anteriormente e pertencente ao género *Pseudomonas sp.* Como controlo positivo foi usado DNA extraído de *Pseudomonas putida* KT2442 bem como o seu produto de amplificação com os *primers* NAPH-1F NAPH-1R [103]. Para avaliar o tamanho dos fragmentos resultantes da amplificação foi utilizado um marcador de pesos moleculares (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, MBI Fermentas). Os géis foram visualizados num transiluminador de UV (Benchtop UV).

### Tipagem genética

Na tentativa de distinguir genótipos para posterior sequenciação de DNA, procedeu-se, numa primeira fase, à tipagem molecular de um subconjunto dos isolados, aplicando um método de PCR, com o primer BOX A1R [104] Na impossibilidade de proceder à sequenciação de representantes de todos os genótipos constituídos com o lote inicial de 77 isolados, este subconjunto foi definido pelos presumíveis *Pseudomonas*, ou seja os isolados para os quais se obteve resultado positivo para a amplificação do gene *gacA*. Uma alíquota de DNA genómico (1 µL) foi usada como substrato numa reacção de PCR de 25 µL contendo: 1.25 µL de 1x PCR tampão KCl, 1.25 1x tampão PCR (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.5 µL de 5% DMSO, 3 µL de MgCl<sub>2</sub>, 2.5 µL de dNTPs (200µM de cada nucleótido), 2 µL de *primer* BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') [104] e 1 µL de 1 U Taq polimerase. A

## Material e Métodos

amplificação foi realizada num termociclador Multigene TC 9600-G (*Labnet Internacional, Inc.*) em condições adaptadas de Rademaker *et al* 2000 [105]: desnaturação inicial a 94°C durante 5min; 30 ciclos de: desnaturação a 94°C durante 1min); "anelamento" a 53°C durante 1 min, extensão a 65°C durante 8 min; e extensão final 65°C durante 18 min. Foram usados dNTPs, Taq polimerase, tampão PCR e MgCl<sub>2</sub> adquiridos à MBI Fermentas. O produto de PCR (10µL) foi confirmado por electroforese em gel de agarose 1.5% (Fluka), com brometo de etídio (VWR), a 100V durante aproximadamente 180min em tampão TAE 1x (0.04M Tris-Acetato, Sigma; 0.001M EDTA, Sigma; pH 8.0). O gel foi visualizado num transiluminador de UV (Benchtop UV). Para avaliar o tamanho dos fragmentos resultantes da amplificação foi utilizado um marcador de pesos moleculares (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, MBI Fermentas). Os géis foram fotografados numa máquina Canon Powershot G10. As imagens foram posteriormente optimizadas usando o software para tratamento de imagem GIMP 2. (GNU Image Manipulation Program, Free Software Foundation Boston, EUA). Posteriormente as imagens foram analisadas usando o software GelCompar e foram construídos os dendrogramas aplicando o índice de Jaccard de presença/ausência com correlação mínima de 5%.

### Sequenciação dos isolados

Sequências dos genes codificantes do RNA ribossomal da subunidade 16S (16S rRNA) dos isolados escolhidos para sequenciação como representantes de cada um dos genótipos, deduzidos por tipagem por BOX-PCR, foram amplificadas com os primers U27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3') [106] (IBA GmbH). As reacções de PCR foram realizadas em misturas reaccionais de 25 µL contendo 1 µL de amostra, 1 U de Taq polimerase, tampão KCl 1x, 0.2 mM de dNTPs, 3.75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1 µM de cada *primer*, 0.25 mg de BSA (Sigma) e água desionizada esterilizada. As condições de PCR foram as seguintes: um passo de desnaturação inicial a 94°C durante 5min seguido de 25 ciclos de desnaturação a 94°C durante 45 s, *anelamento* a 56°C durante 45 s e extensão a 72°C durante 90 s. A reacção de PCR foi concluída com um passo de extensão final de 72°C durante 10 min.

O produto de amplificação do gene que codifica o rRNA 16S foi sequenciado pela empresa Stabvida. As sequências obtidas foram classificadas com o programa Naive Bayesian rRNA Classifier (Version 2.0) do RDP (Ribossomal Database Project-<http://rdp.cme.msu.edu>) e comparadas com as sequências existentes no GenBank

utilizando o software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) de modo a obter uma correspondência dos parentes filogenéticos mais próximos.

### Produção de biossurfactantes

A produção de biossurfactantes foi avaliada em meio sólido usando uma adaptação de um método descrito por Burch *et al* [107]. Este método é mais sensível para detectar baixas concentrações de biossurfactante do que o método mais aplicado, o *drop-collapse* [107] e permite uma rápida triagem de um grande número de isolados [107].

O subconjunto dos 53 isolados positivos para o gene *gacA* previamente conservadas a -20°C em glicerol, foram revivificados meio PY líquido e mantidos sob agitação 120-170 rpm à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) até se observar crescimento. Posteriormente, foram repicados para meio PY sólido com a extremidade um palito, de modo a resultar crescimento de apenas uma colónia. As culturas foram mantidas à temperatura ambiente até se verificar crescimento.

A detecção de biossurfactante em torno de cada colónia foi efectuada por nebulização de parafina líquida (Merck) sobre a superfície da placa, à pressão 1.02-1.36 atm, com recurso a um aerógrafo mantido a uma distância constante em relação à superfície do meio de cultura. A produção de biossurfactante foi detectada pela formação instantânea de um halo visível em redor da colónia por aplicação de uma fonte indirecta, e preferencialmente lateral de luz.

Como controlo positivo usou-se soluções dos surfactantes sintéticos SDS (BioRad), CTAB (Sigma) e Tween 80 (nome IUPAC: Polioxietileno (20),4 sorbitan monoleato - Merck) nas concentrações de 8, 0.2 e 0.008 mM, respectivamente e o biossurfactante surfactina (Sigma) na concentração de 1.15 nM. Uma gotícula de 2 µl de cada um dos surfactantes-controle foi colocada sobre meio PY sólido, que foi colocado numa estufa a 25°C durante 1 h para secar, antes da nebulização com óleo mineral. Como controlo negativo usa-se *Escherichia coli* DH5α, uma estirpe que não produz biossurfactante [107], e por isso não apresenta halo em redor da colónia. *E. coli* DH5α foi repicada para meio PY sólido a partir de uma cultura em meio líquido LB adicionado de ampicilina (3 mgml<sup>-1</sup>), e incubada à temperatura de 32°C.





## Resultados



## Resultados

### *Quantificação de bactérias resistentes a surfactantes*

Os resultados da quantificação de bactérias resistentes a surfactantes são representados na Figura 4. Os teores de UFCs registados foram 1,02, 0,90 e 1,04, respectivamente em meio selectivo com SDS, com CTAB e em meio não selectivo. Em valores relativos, verifica-se que os teores em meio adicionado de SDS e em meio adicionado de CTAB correspondem a 98,4% e 86,5% dos teores obtidos em meio não adicionado, respectivamente. A diferença entre as contagens em meio com SDS e com CTAB não é estatisticamente significativa (ANOVA > 0.05).

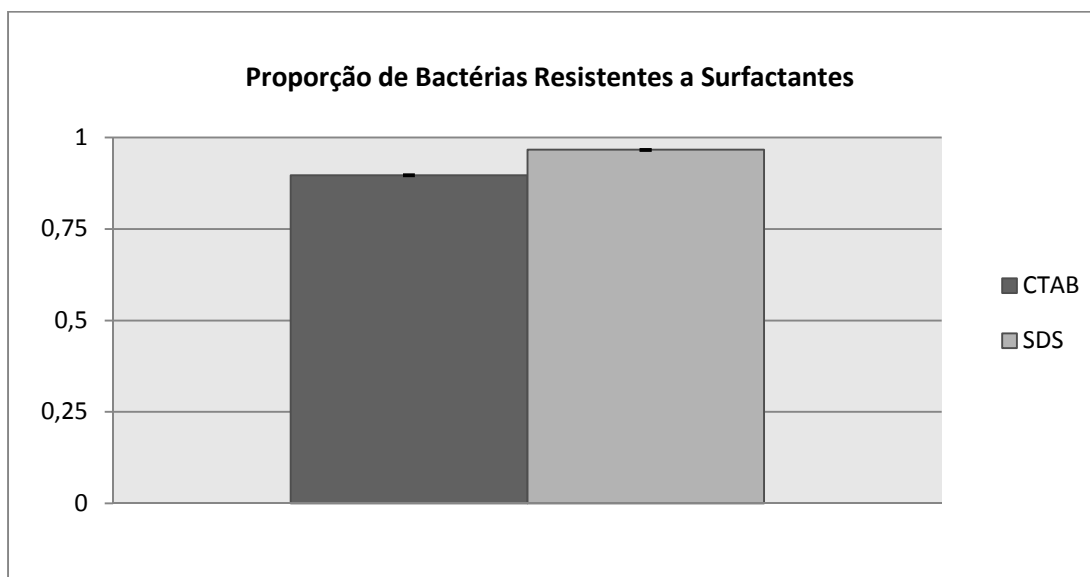


Figura 4 - Fração de bactérias resistentes a surfactantes:  
teor em meio selectivo / teor em meio não selectivo.

### *Isolamento de bactérias resistentes a surfactantes*

A partir duma amostra de SML recolhida obteve-se, ao longo de 8 semanas de cultura em meios selectivos com surfactante, um elevado número de colónias morfológicamente distintas das quais resultou um conjunto inicial de 127 isolados bacterianos. No entanto, por impossibilidade de estudar todos os isolados obtidos, a caracterização molecular foi feita apenas num subconjunto aleatório de 77 isolados.

*Caracterização dos isolados bacterianos*

Detecção do gene *ndo* (naftaleno dioxigenase)

Os primers PAH e NAPH [101] específicos para um gene codificante para o naftaleno dioxigenase não resultaram em amplificação positiva em nenhum dos 77 isolados testados.

Detecção do *gacA*

A reacção de PCR com os primers *gacA* [99] específicos para o género *Pseudomonas* efectuada num conjunto de 77 isolados resultou em amplificação positiva em 34 isolados (Figura 5) , indicando que o género *Pseudomonas* corresponde a 44% dos isolados testados (Figura 6).

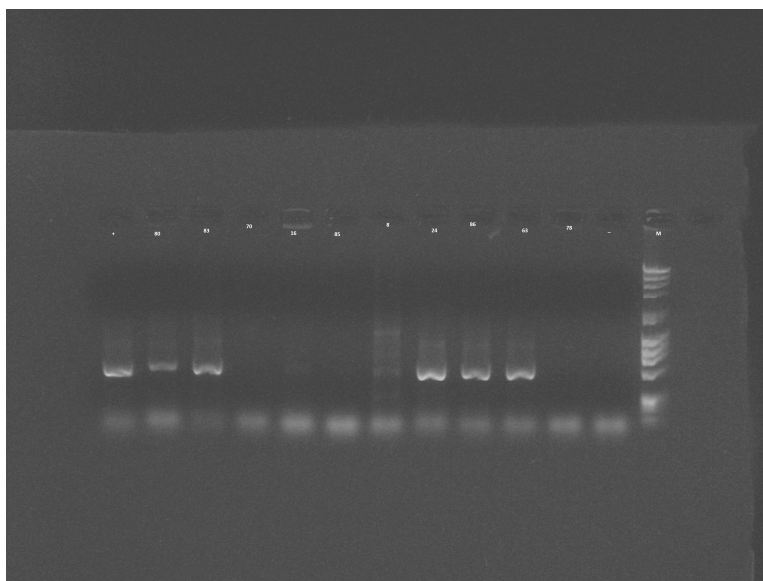


Figura 5 - Exemplo de imagem do resultado de uma electroforese em gel de agarose do produto de amplificação do PCR para o gene *gacA*, marcador específico do género *Pseudomonas*, realizado num subconjunto de 10 isolados.

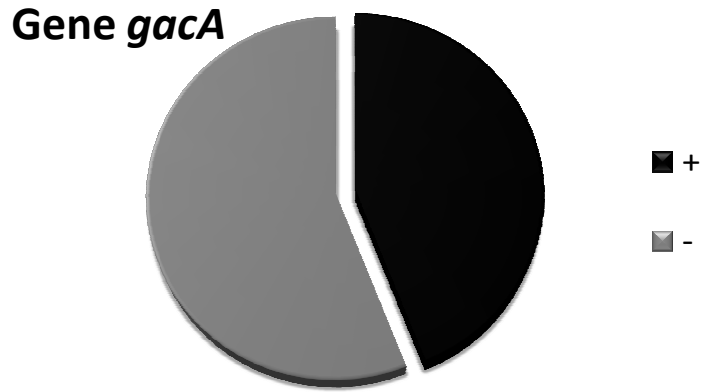


Figura 6 - Proporção relativa do género *Pseudomonas* no subconjunto de 77 isolados bacterianos testados para o gene *gacA*.

### Produção de biossurfactantes

A produção de biossurfactantes, avaliada num subconjunto de 53 isolados (todos fazem parte do primeiro subconjunto analisado na caracterização molecular) e revelou a formação de halo indicativo de libertação de biossurfactante para o meio (Figura 7– C e D), em 5 isolados

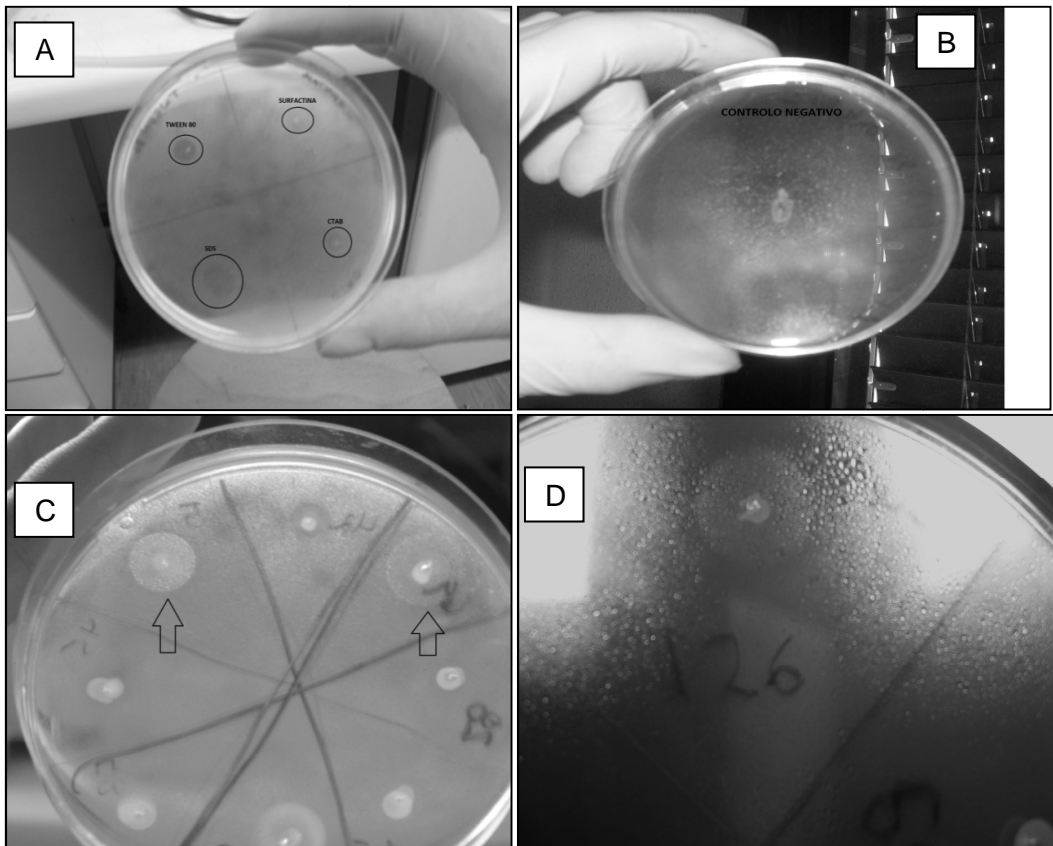


Figura 7 - A) Controlos positivos: SDS (10mM); CTAB (0.2mM); Tween 80 (0.008mM); Surfactina (0.0154mM); B) Controlo negativo: *Escherichia Coli* DH5 $\alpha$ ; C e D) Resultados positivos de produção de biossurfactantes.

## Tipagem genética

A tipagem do subconjunto de 33 isolados que revelaram amplificação positiva para o gene A, com o *primer* BOX-A1R [104] permitiu formar 16 genótipos com número variável de isolados (Figura 8). Esta abordagem permitiu seleccionar um representante de cada clone para posterior sequenciação de DNA

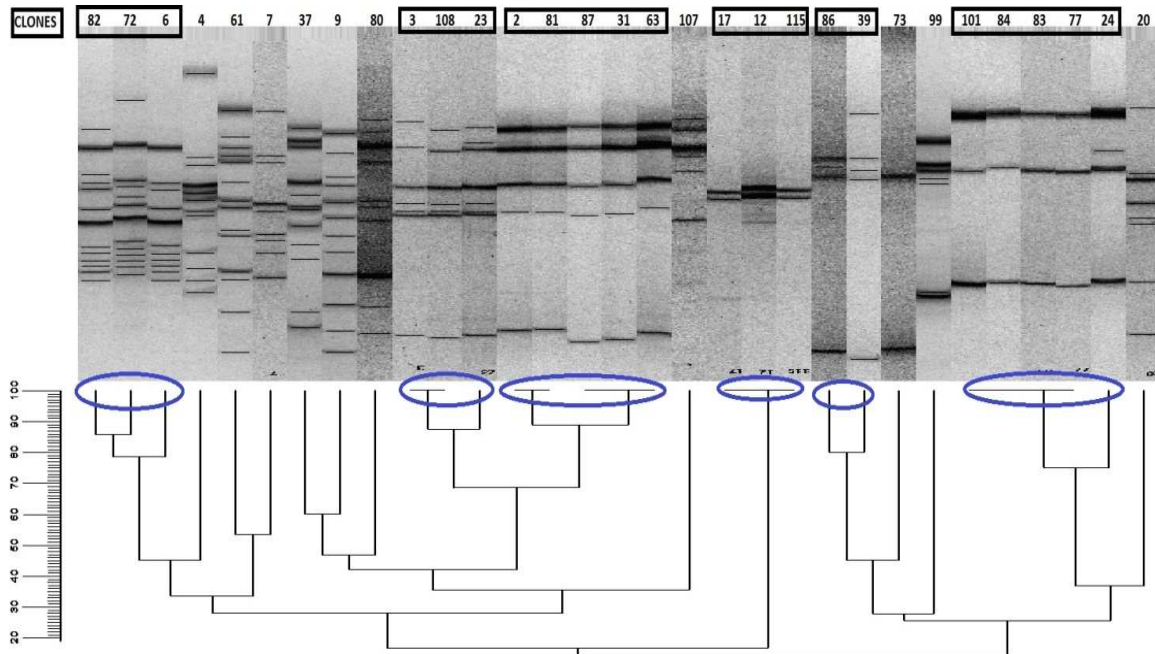


Figura 8 - Dendrograma com resultados da electroforese dos produtos de PCR com o primer BOX-A1R. Cada número corresponde a um isolado. O agrupamento dos números em caixa corresponde a um conjunto de isolados molecularmente idênticas, ou seja, clones.

## Sequenciação

Na Tabela 1 são apresentados os dados dos isolados cuja identificação foi conseguida com sucesso. Um isolado foi seleccionado como representantes de cada clone. Na Tabela 1 está descrito o meio selectivo em que foram obtidos e o resultado do teste de produção de biosurfactante em meio sólido. Os isolados 20, 99, 77 e 61 testaram positivo para a produção de biosurfactante, sendo que isolado 77 testou positivo em dois genótipos, mas só um deles foi sequenciado.

## Isolamento e Caracterização de Bactérias Resistentes a Surfactantes

Tabela 1 - Identidade dos isolados sujeitos a sequenciação de DNA e resultado do teste de produção de biossurfactante em meio sólido.

<b>Isolado</b>	<b>Surfactante adicionado à cultura selectiva</b>	<b>Número de isolados do Clone</b>	<b>Produção de biossurfactante</b>
20	CTAB	1	Sim
99	CTAB	1	Sim
77	SDS	5	Sim*
61	SDS	1	Sim
108	CTAB	3	Não
37	CTAB	1	Não
81	CTAB	5	Não
9	CTAB	1	Não
73	CTAB	1	Não
39	CTAB	2	Não
80	SDS	1	Não
115	SDS	3	Não
7	SDS	1	Não

\* Dois genótipos testaram positivo para a produção de biossurfactantes

O resultado da análise das sequências de genes codificantes do rRNA 16S determinadas pela StabVida é apresentado na Tabela 2. Obteve-se identificação para 13 dos 18 isolados sequenciados. O programa Naive Bayesian rRNA Classifier (Version 2.0) do RDP (Ribossomal Database Project- <http://rdp.cme.msu.edu>) classificou todos os isolados, excepto o 73 e 7, com 100% de certeza, na classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Pseudomonadales*, família *Pseudomonadaceae*, e género *Pseudomonas*. O isolado 73 foi classificado com 100% de certeza na classe *Gammaproteobacteria*, 95% na ordem *Pseudomonadales*, 94% na família *Pseudomonadaceae* e 61% no género *Pseudomonas*. Enquanto o isolado foi classificado com 100% na classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Pseudomonadales* e família *Pseudomonadaceae*, mas com 76% no género *Pseudomonas*.

Comparação com a base de dados GenBank utilizando o software BLAST revelou, para todos os isolados excepto o 73 e 7, 99% com sequências existentes e publicadas. Os isolados 73 e 7 obtiveram um máximo de similaridade de 95% e 96% respectivamente.



## Isolamento e Caracterização de Bactérias Resistentes a Surfactantes

Tabela 2 – Classificação dos resultados da sequenciação dos isolados através do RDP Classifier e comparação com a base de dados GenBank.

Isolado	Classificação RDP		BLAST	Accession n°	%
	(classe/ordem/família/gênero)	%			
20	<i>Gammaproteobacteria</i>	100%	<i>Pseudomonas</i> sp. [108]	GQ891862	99%
	<i>Pseudomonadales</i>	100%			
	<i>Pseudomonadaceae</i>	100%			
	<i>Pseudomonas</i>	100%			
99	<i>Gammaproteobacteria</i>	100%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [109]	HM067869	99%
	<i>Pseudomonadales</i>	100%			
	<i>Pseudomonadaceae</i>	100%			
	<i>Pseudomonas</i>	100%			
77	<i>Gammaproteobacteria</i>	100%	<i>Pseudomonas</i> sp.[110]	GU368377	99%
	<i>Pseudomonadales</i>	100%			
	<i>Pseudomonadaceae</i>	100%			
	<i>Pseudomonas</i>	100%			
61	<i>Gammaproteobacteria</i>	100%	<i>Pseudomonas fluorescens</i> [111]	EF528260	99%
	<i>Pseudomonadales</i>	100%			
	<i>Pseudomonadaceae</i>	100%			
	<i>Pseudomonas</i>	100%			
108	<i>Gammaproteobacteria</i>	100%	<i>Pseudomonas putida</i> [112]	FJ472859	99%
	<i>Pseudomonadales</i>	100%			
	<i>Pseudomonadaceae</i>	100%			
	<i>Pseudomonas</i>	100%			
37	<i>Gammaproteobacteria</i>	100%	<i>Pseudomonas putida</i> [112]	FJ472859	99%
	<i>Pseudomonadales</i>	100%			
	<i>Pseudomonadaceae</i>	100%			
	<i>Pseudomonas</i>	100%			
81	<i>Gammaproteobacteria</i>	100%	<i>Pseudomonas putida</i> [112]	FJ472859	99%
	<i>Pseudomonadales</i>	100%			
	<i>Pseudomonadaceae</i>	100%			
	<i>Pseudomonas</i>	100%			
9	<i>Gammaproteobacteria</i>	100%	<i>Pseudomonas</i> sp. [113]	GQ153646	99%
	<i>Pseudomonadales</i>	100%			
	<i>Pseudomonadaceae</i>	100%			
	<i>Pseudomonas</i>	100%			
73	<i>Gammaproteobacteria</i>	100%	<i>Pseudomonas gingeri</i> [114]	AF320991	95%
	<i>Pseudomonadales</i>	95%			

Isolamento e Caracterização de Bactérias Resistentes a Surfactantes

	<i>Pseudomonadaceae</i>	94%			
	<i>Pseudomonas</i>	61%			
<b>39</b>	<i>Gammaproteobacteria</i>	100%	<i>Pseudomonas putida</i> [115]	FJ611926	99%
	<i>Pseudomonadales</i>	100%			
	<i>Pseudomonadaceae</i>	100%			
	<i>Pseudomonas</i>	100%			
<b>80</b>	<i>Gammaproteobacteria</i>	100%	<i>Pseudomonas sp.</i> [113]	GQ153646	99%
	<i>Pseudomonadales</i>	100%			
	<i>Pseudomonadaceae</i>	100%			
	<i>Pseudomonas</i>	100%			
<b>115</b>	<i>Gammaproteobacteria</i>	100%	<i>Pseudomonas sp.</i> [113]	GQ153646	99%
	<i>Pseudomonadales</i>	100%			
	<i>Pseudomonadaceae</i>	100%			
	<i>Pseudomonas</i>	100%			
<b>7</b>	<i>Gammaproteobacteria</i>	100%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	FJ950603	96%
	<i>Pseudomonadales</i>	100%	[116]		
	<i>Pseudomonadaceae</i>	100%			
	<i>Pseudomonas</i>	76%			



## Discussão



## Discussão

### *Tolerância do bacterioneuston a surfactantes*

O efeito tóxico dos surfactantes sobre a comunidade cultivável do bacterioneuston foi testado comparando o teor de viáveis obtidas em meio selectivo com o teor em meio não selectivo. O teor de cultiváveis em meio com SDS ou com CTAB corresponderam a 98,4% e a 86,5% do teor calculado em meio não selectivo. O bacterioneuston tolera concentrações de SDS e CTAB superiores a 70mM e 1mM. Estudos sobre os efeitos toxicológicos do surfactante aniónico SDS em bactérias, evidenciam a inibição do crescimento e da fixação de azoto na cianobactéria *Gloeocapsa* a partir da concentração de 0.173mM [117], uma concentração letal para 50% dos organismos ( $LC_{50}$ ) é de  $9.02 \times 10^{-3}$ mM em *Vibrio Fischeri* [118] e  $5.00 \times 10^{-3}$ mM para *Acinetobacter junii* [47] e a perda de viabilidade em *Acinetobacter johnsonii* e *Oligotropha carboxidovorans* a partir das concentrações de 0,69 e 6.94mM respectivamente [119]. Resultados similares são descritos para CTAB ou surfactantes catiónicos análogos. A  $CL_{50}$  de CTAB para *A. junii* foi de  $3.27 \times 10^{-4}$ mM [47]. Estes valores são inferiores aos usados neste trabalho o que demonstra a elevada tolerância do bacterioneuston a surfactantes sintéticos.

Apesar das contagens de colónias em meio com CTAB relativamente ao controle, serem inferiores às contagens em SDS esta diferença não é estaticamente significativa (ANOVA > 0.05). Contrariamente ao que é referido na literatura [9, 25], o CTAB não aparenta ser mais tóxico para o bacterioneuston do que o surfactante aniónico SDS. A tolerância igual do bacterioneuston para surfactantes catiónicos e aniónicos demonstra que os mecanismos de tolerância do bacterioneuston da Ria de Aveiro deve ser semelhantes para ambos os surfactantes utilizados.

A hipótese de que um ambiente rico em surfactantes selecciona para fenótipos de resistência a surfactantes confirma-se nas condições da SML da Ria de Aveiro. Estudos prévios em ambientes ricos em surfactantes de origem antropogénica revelaram resultados idênticos, com surfactantes catiónicos [9, 68] e aniónicos [9].

### *Isolados bacterianos resistentes a surfactantes*

As culturas selectivas em meios adicionados de surfactantes sintéticos resultaram em 127 isolados de bacterioneuston. Os isolados foram escolhidos com base na morfologia das colónias. Deste modo tentou reduzir-se *a priori* a repetição de génotipos abrangendo o mais possível a comunidade cultivável da SML. O elevado

## *Isolamento e Caracterização de Bactérias Resistentes a Surfactantes*

número de isolados obtidos reflecte a elevada abundância absoluta e diversidade de bactérias resistentes a surfactantes da SML. A capacidade de tolerar surfactantes em concentrações idênticas ou mesmo superiores à CMC é partilhada por várias bactérias cultiváveis do bacterioneuston. No entanto, este trabalho não permite concluir da resistência comparativa de bacterioneuston e bacterioplâncton, uma vez que não se procedeu à caracterização deste último. Futuros trabalhos poderão confirmar se a SML apresenta maior abundância e diversidade de bactérias resistentes a surfactantes do que as águas subjacentes.

A elevada abundância e diversidade de bactérias resistentes a surfactantes encontrada neste estudo podem ser explicadas pela adaptação do bacterioneuston a níveis elevados de surfactantes de origem natural e antropogénica que ocorrem no SML devido à sua localização interfacial [120-121]. A SML acumula inúmeros compostos químicos, entre os surfactantes e substâncias hidrofóbicas [73]. A amostra usada foi recolhida no estuário da Ria de Aveiro, numa zona de forte actividade portuária e próxima do denso núcleo populacional da Gafanha da Nazaré. Em ambientes aquáticos semi-fechados como os estuários e especialmente na proximidade de zonas urbanas e portuárias, esta acumulação é especialmente evidente [16].

## *Produção de Biosurfactantes*

As bactérias produtoras de biosurfactantes são tolerantes ao efeito dos surfactantes sintéticos [9], por isso, uma cultura selectiva poderá simultaneamente aumentar a abundância relativa das bactérias produtoras de biosurfactantes, como já foi evidenciado noutros trabalhos [9]. Estudos prévios de isolamento e caracterização a partir de sedimentos contaminados com surfactantes, revelaram que elevado número de espécies bacterianas produtoras e tolerantes a surfactantes [68].

O método de Burch *et al* [107] revelou ser um método rápido de detecção de biosurfactantes no qual persistem, no entanto, algumas limitações nomeadamente quanto à subjectividade da leitura dos resultados. Este ensaio detecta de igual modo biosurfactantes lipopeptídicos e glicolipídicos de origem bacteriana [107]. O método resume-se à aplicação de um aerosol de gotículas de óleo mineral sobre a superfície do meio agarizado.

Num conjunto de 53 isolados testados pelo método de Burch *et al* [107], só em 5 (9.6%) foi detectada produção de biosurfactante em concentração suficiente para que fosse possível visualizar um halo claro em redor da colónia. Não fica, no entanto,

completamente excluída a possibilidade de que outros isolados tenham também produzido pequenas quantidades de biossurfactante.

A baixa proporção de bactérias produtoras de biossurfactantes é comum em ensaios de isolamento com culturas de selectivas [122-123]. Willumsen e Karlson obtiveram 57 isolados de uma cultura de enriquecimento em PAH em que apenas 4 (7%) produziam biossurfactantes [122]. Mercadé *et al* obteve produção de biossurfactantes em 11,4% dos isolados de culturas de enriquecimento com substrato hidrofóbico [123]. Grande parte dos estudos de isolamento de bactérias produtoras de biossurfactantes utilizam culturas de enriquecimento com substratos hidrofóbicos [78]. Este método constitui uma abordagem indirecta, pois a produção de biossurfactantes apesar de ocorrer em bactérias degradadoras de hidrocarbonetos não está correlacionado com esta característica [78]. Contraditoriamente, Plante *et al* 2008 obteve uma elevada percentagem (73,8%) de estirpes produtoras de biossurfactantes em meio selectivo com surfactantes sintéticos [9]. Os isolados bacterianos foram recolhidos num ambiente naturalmente rico em surfactantes (sistema digestivo de poliquetas marinhos) [9]. Todavia as concentrações obtidas são baixas (50 a 63 mgL<sup>-1</sup>) [9] e o método aplicado (*oil-spreading* [124]) é considerado pelos autores mais sensível que outros métodos. Não existem estudos comparativos entre o método descrito por Burch *et al* [107] e o método de *oil-spreading* [124] pelo que não é possível comparar a sensibilidade do estudo de Plante *et al* 2008 com o presente trabalho.

A produção de biossurfactantes é influenciada pelas condições de cultivo. Elevada produção de biossurfactantes foi obtida sob condições optimizadas relativamente à composição do meio, temperatura e disponibilidade/limitação de nutrientes [125-126]. Possivelmente, as condições e meio de cultura usados neste ensaio não serão as óptimas para a produção de biossurfactantes em alguns isolados. Além disso, diferentes estirpes têm preferência por fontes de carbono distintas para a produção de biossurfactantes [127].

A degradação de composto hidrofóbicos não é um pré-requisito para a produção de biossurfactantes [78]. Meios de enriquecimento com fontes de carbono hidrofóbicas não constituem a única forma de cultivo de bactérias produtoras de biossurfactantes. A síntese de ramnolípidos de *Pseudomonas* tem sido obtida em meios de cultura mais nutritivos, com outras fontes de carbono, como meio marinho Zobell (extracto de levedura, dextrose e péptidos) [128], agar nutritivo (peptona, extracto de levedura e extracto de carne) [129] ou meio mínimo com glucose [130-131]. De igual modo, em meio PY adicionado de surfactantes sintéticos como agentes selectivos, conseguiu-se o isolamento de estirpes produtoras de biossurfactantes pelo



que os próprios surfactantes sintéticos podem estar a ser utilizados como fonte de carbono para a síntese de biossurfactantes [9].

*Identificação e caracterização molecular dos isolados de bacterioneuston resistentes a surfactantes*

O género *Pseudomonas*

A caracterização molecular dos isolados foi dirigida aos isolados para os quais tinha sido obtida amplificação do gene *gacA*, e assim estavam presumidamente identificados como pertencentes ao género *Pseudomonas*. *Pseudomonas* é um género de elevado interesse biotecnológico particularmente em biorremediação [132]. A versatilidade nutricional de *Pseudomonas* é elevada [99, 133] e inúmeros artigos evidenciam a sua capacidade para degradar diversos compostos xenobióticos [66, 103, 115, 132, 134-137]. Este género é considerado como tolerante a surfactantes aniónicos [66] e catiónicos [67] e como produtor de biossurfactantes [42, 107, 138]. Além disto, é um género bem representado na Ria de Aveiro, já foi isolado da SML em culturas de enriquecimento com PAH, constituindo 34,5% dos isolados degradadores de PAHs [92].

O presente estudo confirma a elevada representação de *Pseudomonas* na fracção cultivável do bacterioneuston resistente a surfactantes sintéticos (44%). Este trabalho confirma, em continuidade com outros estudos sobre o bacterioneuston da Ria de Aveiro [92], a relevância do género *Pseudomonas* nas condições particulares da SML.

Verificou-se que os 5 isolados que produziam biossurfactantes foram confirmados por sequenciação como pertencentes ao género *Pseudomonas*. O género *Pseudomonas* é um conhecido produtor de biossurfactante, particularmente ramnolípidos [109]. Estirpes do género *Pseudomonas* produtoras de biossurfactantes já foram isoladas de diversos ambientes: solos contaminados com poluentes hidrofóbicos [109, 139], águas marinhas costeiras (Mar Mediterrâneo) [140-141], águas doces sem contaminação por poluentes hidrofóbicos [142] e até no ar [143].

### *Genes envolvidos na degradação do PAH naftaleno*

A pesquisa de genes envolvidos no primeiro passo da degradação aeróbica de degradação de PAH, nomeadamente o naftaleno (genes codificantes para naftaleno dioxigenases), revelaram-se negativos para todos os isolados. Contudo, não se pode descartar a hipótese de que os isolados apresentem capacidade de degradar o naftaleno ou de que os genes estejam presentes. Os *primers* usados são específicos para determinadas grupos filogenéticos e não abrangem totalmente a elevada variabilidade de genes *ndo* conhecidos [100]. Posteriormente, *primers* mais abrangentes adaptados de Iwai *et al* [102] foram testados. Contudo, não se obteve ainda amplificação havendo necessidade de proceder a uma optimização do método.

Genes degradativos, como o *ndo*, são frequentemente encontrados em elementos genéticos móveis, designadamente plasmídeos [144]. A falta de pressão selectiva que favoreça a manutenção dos plasmídeos poderá ter levado à perda dos mesmos durante os passos de isolamento, purificação e cultura em laboratório [145-146]. Como meios selectivos com surfactante foram usados e não meios de enriquecimento com PAH, o isolamento de bactérias com plasmídeos que albergasse genes catabólicos do naftaleno seria difícil, o que pode explicar os resultados obtidos.

### *Sequenciação e confirmação da identificação*

As sequências do produto de PCR do gene codificante do rRNA 16S usando os *primers* descritos, foram analisadas usando duas ferramentas: o RDP Classifier e o BLAST. RDP Classifier determina a filogenia da sequência obtida. O BLAST compara a sequência obtida com outras sequências existentes na base dados e calcula os respectivos índices de similaridade. No final verificou-se que para todos os isolados foi possível uma identificação com elevado grau de confiança pertencem ao género *Pseudomonas*.

A similaridade obtida foi >99% para maior parte dos isolados. Os isolados obtidos apresentam similaridade filogenética com estirpes degradadoras de hidrocarbonetos e produtoras de biosurfactantes. Por exemplo, o isolado 99 recuperado na cultura selectiva com CTAB revelou produção de um biosurfactante. A comparação na base de dados GenBank correlacionou a sequência deste, com várias estirpes, nomeadamente *Pseudomonas aeruginosa* GIM 32. Esta estirpe microbiana foi já isolada de solo contaminado com hidrocarbonetos e exibiu elevada produção de ramnolípidos de elevada actividade emulsionante [109]. Esta estirpe revelou elevada produção de ramnolípidos quando cultivada em substratos económicos como óleo de

palma e resíduos da destilação de meloço, sendo por isso considerada de elevado potencial económico e biotecnológico [109].

Estirpes com elevada similaridade com os isolados obtidos neste estudo foram também isoladas de locais contaminados ou de culturas de enriquecimentos com poluentes hidrofóbicos. Exemplo disso são os isolados 81, 108, 37, 61, 39, 80, 115, 9 e 20. Os isolados 81, 108 e 37, pertencentes a três genótipos diferentes, obtidos na cultura selectiva em CTAB, todos têm uma similaridade de 99% com *Pseudomonas putida* JM7. *Pseudomonas putida* JM7 foi anteriormente isolada de culturas de enriquecimento com fenantreno [112]. Outro isolado, o 61 foi obtido na cultura selectiva em SDS. A comparação da sequência deste isolado com a base de dados GenBank correlacionou-o com *Pseudomonas fluorescens* AE1, uma estirpe anteriormente isolada em sedimentos contaminados com PAH no mar Báltico [111]. O isolado 39 pertencente, da espécie *Pseudomonas putida*, foi isolado a partir da cultura selectiva em CTAB. A base de dados GenBank permitiu relacioná-lo com a estirpe *Pseudomonas putida* KT-ql-116 isolada em águas residuais e que exibe capacidades degradativas do quilone, um PAH azotado [115]. Os isolados 80, 115 e 9 foram isolados da cultura selectiva com SDS (80 e 115) e CTAB (9) (Tabela 1). A comparação com a informação do GenBank relaciona estas as sequências com a estirpe *Pseudomonas sp.* ANT-2400 isolada em culturas de enriquecimento com alcanos a partir de amostras de sedimentos de mar profundo (2400m) do Mediterrâneo [113]. Por último, o isolado 20 teve elevada similaridade com *Pseudomonas sp.* DIC1RS, uma estirpe anteriormente isolada de um consórcio eficiente na degradação de uma mistura de PAHs [108].

O isolado 77 foi isolado da cultura selectiva com SDS e revelou produção de biossurfactantes. Revelou elevada semelhança com a estirpe *Pseudomonas sp.* JPPB B25 [110] anteriormente isolada de biofilmes de canalizações em cobre [110]. A produção de biossurfactantes é comum em estirpes formadoras de biofilmes [65], e particularmente em *Pseudomonas* [147]. A síntese de biossurfactantes ocorre preferencialmente nos estágios iniciais de formação de um biofilme [148]. Os biossurfactantes produzido por *Pseudomonas aeruginosa* desempenham funções de estruturação do sistema de canais do biofilme maduro e de dispersão das células persistentes [147].

Os isolados 73 e 7 apresentam uma similaridade máxima com as sequências actualmente existentes na base de dados de 95 e 96%, respectivamente. Estes isolados podem pertencer a espécies ou géneros novos mas mais estudos são precisos para comprovar.

Uma similaridade máximo de 96% correlacionou o isolado 7, obtido a partir da cultura selectiva com SDS, com *Pseudomonas fluorescens* c6 [116]. *Pseudomonas fluorescens* c6 foi isolado de águas residuais de uma fábrica de oxitetraciclina, um antibiótico de largo espectro e revelou resistência a esta classe de antibióticos. A resistência a tetraciclina pode estar associada à resistência a surfactantes. Bactérias resistentes a surfactantes tornam-se resistentes a diversos antibióticos, entre eles as tetraciclina [62], acontecendo também o recíproco, isto é, bactérias resistentes a antibióticos apresentam elevada tolerância a surfactantes [149]. Os mecanismos de resistência bacteriana a surfactantes são também encontrados em bactérias resistentes a antibióticos [149]: alterações na composição da membrana externa [60] e aumento dos mecanismos de efluxo. Por último o isolado 73 teve uma similaridade de 95% com *Pseudomonas gingivi* [114]. Esta estirpe foi isolado como um agente patogénico de macrofungos, pelo que não representa grande relevância para o estudo [114].



## Conclusão



## Conclusão

Com este trabalho pretendeu-se avaliar o potencial biotecnológico da SML da Ria de Aveiro, designadamente quanto à existência de bactérias simultaneamente resistentes a surfactantes sintéticos e com capacidade de produzir biossurfactantes. Esta hipótese foi formulada com base na literatura existente, que refere a SML como um compartimento com características abióticas dissimilares das águas subjacentes, designadamente quanto à acumulação de poluentes e surfactantes e ainda quando à produção de biossurfactantes por parte dos microrganismos como estratégia de adaptação à tensão superficial que caracteriza este habitat interfacial. A presença simultânea de elevadas concentrações de compostos hidrofóbicos e surfactantes poderia conferir ao bacterioneuston adaptações interessantes potencialmente aplicáveis em novos esforços de biorremediação *in situ*. Este foi o enquadramento inicial do trabalho que compõe esta dissertação.

A comparação dos teores de bactérias cultiváveis obtidos com e sem surfactantes sintéticos adicionados indicou que mais de 80% da comunidade cultivável cresce na presença dos surfactantes testados, confirmando a elevada tolerância do bacterioneuston a estes compostos. O elevado número de isolados obtidos conclui que o bacterioneuston é abundante.

A caracterização molecular de um conjunto de isolados representativos da fracção cultivável da comunidade de bacterioneuston tolerante a SDS ou CTAB, revelou a relevância do género *Pseudomonas*, bem como a capacidade de alguns isolados deste género para a produção de biossurfactantes em culturas não selectivas.

A comparação de sequências 16S do RNA ribossomal dos isolados do género *Pseudomonas* obtidos neste trabalho, através da ferramenta BLAST, revelou elevada similaridade com estirpes produtoras de biossurfactantes e degradadoras de poluentes hidrofóbicos isoladas em diferentes ambientes.

A presença do gene *ndo*, interpretado como marcador da capacidade para catabolizar PAH, não foi detectada por técnicas de PCR em nenhum dos isolados testados. Todavia, esta capacidade metabólica, não é de excluir pois os *primers* usados têm uma abrangência limitada e, sobretudo, a estratégia de isolamento não seleccionou para a presença de plasmídeos degradativos, aos quais este gene está frequentemente associado.

A produção de biossurfactantes é uma estratégia bacteriana de adaptação à vida interfacial, ou de resposta à presença de surfactantes sintéticos. Usando um



método simples e expedito, foi possível detectar a produção de biossurfactante em 5 isolados, identificados como *Pseudomonas*. Numa continuação deste trabalho, o rastreio poderá ser alargado ao conjunto completo dos isolados da colecção, podendo ainda ser confirmado por análise molecular dos determinantes genéticos desta capacidade.

Conclui-se assim que a SML da Ria de Aveiro alberga uma comunidade bacteriana de elevada resistência a surfactantes sintéticos e com potencial de biodegradação e de produção de biossurfactantes que justifica a continuação do seu estudo tendo em vista aplicações de biorremediação.

## Bibliografia

1. Harayama, S., et al., *Petroleum Biodegradation in Marine Environments*. J. Molec. Microbiol. Biotechnol, 1999. **1**(1): p. 63-70.
2. Kingston, P.F., *Long-term Environmental Impact of Oil Spills*. Spill Science & Technology Bulletin, 2002. **7**(1-2): p. 53-61.
3. Kebria, Y., et al., *Isolation and Characterization of a novel native Bacillus strain capable of degrading diesel fuel*. International Journal of Environmental Science and Technology, 2009. **6**(3): p. 435-442.
4. Churchill, P., R.J. Dudley, and S.A. Churchill, *Surfactant Enhanced Biorremediation*. Waste Management, 1995. **15**(5/6): p. 371-377.
5. Vasileva-Tonkova, E. and D. Galabova, *Hydrolytic Enzymes and Surfactants of Bacterial Isolates from Lubricant-Contaminated Wastewater*. Z. Naturforsch., 2003. **58c**(87-92).
6. Seo, J.-S., Y.-S. Keum, and Q.X. Li, *Bacterial Degradation of Aromatic Hydrocarbons*. Int. J. Environ. Res. Public Health, 2009. **6**: p. 278-309.
7. Macnaughton, S., et al., *Microbial Population Changes during Bioremediation of an Experimental Oil Spill*. Applied and Environmental Microbiology, 1999. **65**(8): p. 3566–3574.
8. Watanabe, K., *Microrganisms Relevant to Bioremediation*. Current Opinion in Biotechnology, 2001. **12**: p. 237-241.
9. Plante, C., K. Coe, and R. Plante, *Isolation of Surfactant-Resistant Bacteria from Natural Surfactant-Rich Marine Habitats*. Applied and Environmental Microbiology, 2008. **74**(16): p. 5093–5099.
10. Hosokawa, R., et al., *Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009. **25**(9): p. 1519-1528.
11. El Fantroussi, S. and S.N. Agathos, *Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?* 2005. **8**(3): p. 8.
12. Chhatre, S., et al., *Bacterial consortia for crude oil spill remediation*. Water Science and Technology, 1996. **34**(10): p. 187-193.
13. Purohit, H., *Impact of Bioaugmentation with a Consortium of Bacteria on the Remediation of Wastewater-Containing Hydrocarbons (5 pp)*. Environmental Science and Pollution Research, 2007. **14**(1): p. 7-11.
14. Yuan, S.Y., S.H. Wei, and B.V. Chang, *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture*. Chemosphere, 2000. **41**: p. 1463-1468.
15. Samanta, S.K., O.V. Singh, and R.K. Jain, *Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation*. Trends in biotechnology, 2002. **20**(6): p. 243-248.
16. Wurl, O. and J.P. Obbard, *A review of pollutants in the sea-surface microlayer (SML): a unique habitat for marine organisms*. Marine Pollution Bulletin 2004. **48**: p. 1016-1030.
17. Walczak, M. and W. Donderski, *Decomposition of Anionic Surface Active Substances by Bacteria from the Surface Microlayer of Lake Jeziorak Mały*. Polish Journal of Environmental Studies, 2004. **13**(3): p. 325-331.

18. Mrozik, A., Z. Piotrowska-Seget, and S. Labuzek, *Bacterial Degradation and Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Polish Journal of Environmental Studies, 2003.
19. Head, I. and R.P.J. Swannell, *Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats*. Current Opinion in biotechnology, 1999. **10**: p. 234-239.
20. Bamforth, S.M. and I. Singleton, *Review Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2005. **80**: p. 723–736.
21. Caldini, G., et al., *The ability of an environmental isolate of Pseudomonas fluorescens to utilize chrysene and other four-ring polynuclear aromatic hydrocarbons* Applied Microbiology and Biotechnology, 1995. **44**: p. 225-229.
22. Serebriiskaya, T.S., I.V. Lenets, and N.S. Goldenkova, *Identification of nah-1-genes of the Pseudomonas putida naphthalene-degrading NPL-41 plasmid operon*. Mol. Gen. Mikrobiol Virusol, 1999: p. 33-36.
23. Ying, G.-G., *Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment*. Environmental International, 2006. **32**: p. 417-431.
24. Rosen, M.J., *Surfactants and interfacial phenomena / Milton J. Rosen*. 1978, New York :: Wiley.
25. Van Hamme, J.D., A. Singh, and O.P. Ward, *Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology*. Biotechnology Advances, 2006. **24**(6): p. 604-620.
26. Liu, Z., A.M. Jacobsen, and R.G. Luthy, *Biodegradation of Naphthalene in Aqueous Nonionic Surfactant Systems*. Appl. Environ. Microbiol., 1995. **61**(1): p. 145-151.
27. Glover, R.E., et al., *An EPR investigation of surfactant action on bacterial membranes*. FEMS Microbiology Letters, 1999. **177**(1): p. 57-62.
28. Guerin, W.F. and G.E. Jones, *Mineralization of Phenanthrene by a Mycobacterium sp.* Applied and Environmental Microbiology, 1988. **54**(4): p. 937-944.
29. Oberbremer, A., R. Muller-Hurtig, and F. Wagner, *Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor*. Applied Microbiology Biotechnology, 1990. **32**: p. 485-489.
30. Zhang, Y. and R.M. Miller, *Enhanced Octadecane Dispersion and Biodegradation by a Pseudomonas Rhamnolipid Surfactant (Biosurfactant)*. Applied and Environmental Microbiology, 1992. **58**(10): p. 3276-3282.
31. Tiehm, A., *Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Presence of Synthetic Surfactants*. Applied and Environmental Microbiology, 1994. **60**(1): p. 258-263.
32. Volkering, F., et al., *Influence of Nonionic Surfactants on Bioavailability and Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Applied and Environmental Microbiology, 1995. **61**(5): p. 1699-1705.
33. Guha, S. and P.R. Jaffé, *Biodegradation Kinetics of Phenanthrene Partitioned into the Micellar Phase of Nonionic Surfactants*. Environ. Sci. Technol., 1996. **30**: p. 605-611.

34. Schippers, C., et al., *Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture*. Journal of Biotechnology, 2000. **83**: p. 189-198.
35. Venosa, A.D. and E.L. Holder, *Biodegradability of dispersed crude oil at two different temperatures*. Marine Pollution Bulletin, 2007. **54**: p. 545-553.
36. Mulkins-Phillips, G.J. and J.E. Stewart, *Effect of Four Dispersants on Biodegradation and Growth of Bacteria on Crude Oil*. Applied Microbiology, 1974. **28**(4): p. 547-552.
37. Foght, J.M., D.L. Gutnick, and D.W.S. Westlake, *Effect of emulsam on biodegradation of crude oil in pure and mixed cultures*. Applied and Environmental Microbiology, 1989. **55**: p. 36-42.
38. Laha, S. and R. Luthy, *Inhibition of Phenanthrene Mineralization by Nonionic Surfactants in Soil-Water Systems*. Environmental Science Technology, 1991. **25**(11): p. 1920-1930.
39. Efroymsen, R.A. and M. Alexander, *Biodegradation by an Arthrobacter Species of Hydrocarbons Partitioned into an Organic Solvent*. Applied and Environmental Microbiology, 1991. **57**(5): p. 1441-1447.
40. Aronstein, B.N., Y.M. Calvillo, and M. Alexander, *Effect of surfactants at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil*. Environmental Science and Technology., 1991. **25**: p. 1728-1731.
41. Laha, S. and R. Luthy, *Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-water systems*. Biotechnol. Bioeng., 1992. **40**: p. 1367-1380.
42. Zhang, Y. and R. Miller, *Effect of a Pseudomonas Rhamnolipid Biosurfactant on Cell Hydrophobicity and Biodegradation of Octadecane*. Applied and Environmental Microbiology, 1994. **60**(6): p. 2101-2106.
43. Rouse, J.D., D.A. Sabatini, and J.M. Suflita, *Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds*. Critical Reviews Environmental Science Technology, 1994(24): p. 325-370.
44. Bruheim, P., H. Bredholt, and K. Eimhjellen, *Effects of Surfactant Mixtures, Including Corexit 9527, on Bacterial Oxidation of Acetate and Alkanes in Crude Oil*. Applied and Environmental Microbiology, 1999. **65**(4): p. 1658-1661.
45. Willumsen, P.A., U. Karlson, and P.H. Pritchard, *Response of fluoranthene-degrading bacteria to surfactants*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998. **50**(4): p. 475-483.
46. Van Ginkel, C.G., ed. *Biodegradability of cationic surfactants*. Biodegradability of surfactants., ed. D.R. Karsa and M.R. Porter. 1995, Blackie Academic and Professional: London. 183-203.
47. Hrenovic, J. and T. Ivankovic, *Toxicity of anionic and cationic surfactant to Acinetobacter junii in pure culture*. Central European Journal of Biology 2007: p. 405-414.
48. Chapman, J.S., M.A. Diehl, and R.C. Lyman, *Biocide susceptibility and intracellular glutathione in Escherichia coli*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1993. **12**(6): p. 403-407.
49. Nye, J.V., W.F. Guerin, and S.A. Boyd, *Heterotrophic Activity of Microorganisms in Soils Treated with Quaternary Ammonium Compounds*. Environ. Sci. Technol., 1994. **28**: p. 944-951.

50. Scharff, T.G. and W.C. Maupin, *Correlation of the metabolic effects of benzalkonium chloride with its membrane effects in yeast*. *Biochemical Pharmacology*, 1960. **5**(1-2): p. 79-86.
51. Majtan, V., et al., *Effect of quaternary ammonium salts and amine oxides on Pseudomonas aeruginosa*. Vol. 84. 1995, Cambridge, ROYAUME-UNI: Faculty Press.
52. Sakagami, Y., et al., *Mechanism of resistance to benzalkonium chloride by Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989. **55**(8): p. 2036-2040.
53. Cho, H.-Y., et al., *Cell death of Bacillus subtilis caused by surfactants at low concentrations results from induced cell autolysis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1990. **70**(1): p. 11-14.
54. Gaibraith, H., et al., *Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol*. *J. Appl. Bacteriol.*, 1971. **34**: p. 808-813.
55. Merta, J. and P. Stenius, *Interactions between cationic starch and mixed anionic surfactants*. *Colloids Surf*, 1999. **149**: p. 367-377.
56. Nielsen, A.D., K. Borch, and P. Westh, *Thermochemistry of the specific binding of C12 surfactants to bovine serum albumin*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1479**: p. 321-331.
57. Marques, E., et al., *Gel formation and association in systems of cationic surfactant vesicles and oppositely charged polymers*. *Polym Prep*, 2000. **41**: p. 737-738.
58. Bragadin, M., et al., *The accumulation in lysosomes of the anionic detergent linear alkylbenzene sulfonate*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1996. **15**: p. 1749- 1752.
59. Cserhádi, T., E. Forgács, and G. Oros, *Biological activity and environmental impact of anionic surfactants*. *Environmental International*, 2002. **28**: p. 337-348.
60. Tabata, A., et al., *Correlation between Resistance of Pseudomonas aeruginosa to Quaternary Ammonium Compounds and Expression of Outer Membrane Protein OprR*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003. **47**(7): p. 2093-2099.
61. Nakata, K., et al., *All genomic mutations in the antimicrobial surfactant-resistant mutant, Escherichia coli OW66, are involved in cell resistance to surfactant*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010. **87**(5): p. 1895-1905.
62. Ishikawa, S., et al., *Characterization of a cationic surfactant-resistant mutant isolated spontaneously from Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 2002. **92**(2): p. 261-268.
63. Heir, E., G. Sundheim, and A.L. Holck, *The qacG gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry*. *Journal of Applied Microbiology*, 1999. **86**(3): p. 378-388.
64. Bjorland, J., et al., *Novel Plasmid-Borne Gene qacJ Mediates Resistance to Quaternary Ammonium Compounds in Equine Staphylococcus aureus, Staphylococcus simulans, and Staphylococcus intermedius*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003. **47**(10): p. 3046-3052.
65. Ron, E.Z. and E. Rosenberg, *Natural Roles of Biosurfactants*. *Environmental Microbiology*, 2001. **3**(4): p. 229-236.

66. Jovčić, B., et al., *Dynamics of Sodium Dodecyl Sulfate utilization and Antibiotic Susceptibility of Strain Pseudomonas sp. ATCC19151*. Arch. Biol. Sci., 2009. **61**(2): p. 154-164.
67. Takenaka, S., et al., *Adaptation of Pseudomonas sp. Strain 7-6 to Quaternary Ammonium Compounds and Their Degradation via Dual Pathways*. Appl. Environ. Microbiol., 2007. **73**(6): p. 1797-1802.
68. Gaze, W.H., et al., *Incidence of Class 1 Integrons in a Quaternary Ammonium Compound-Polluted Environment*. Antimicrob. Agents Chemother., 2005. **49**(5): p. 1802-1807.
69. Zeng, G., et al., *Co.degradation with glucose of four surfactants, CTAB, Triton-X-100, SDS and Rhamnolipid, in liquid culture media and compost matrix*. Biodegradation, 2007. **18**: p. 303-310.
70. Ventullo, R.M. and R.J. Larson, *Adaptation of Aquatic Microbial Communities to Quaternary Ammonium Compounds*. Appl. Environ. Microbiol., 1986. **51**(2): p. 356-361.
71. Dean-Raymond, D. and M. Alexander, *Bacterial metabolism of quaternary ammonium compounds*. Appl. Environ. Microbiol., 1977. **33**(5): p. 1037-1041.
72. Lajoie, C.A., et al., *Degradation of nonionic surfactants and polychlorinated biphenyls by recombinant field application vectors*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1997. **19**(4): p. 252-262.
73. Wurl, O., et al., *The distribution and fate of surface-active substances in the sea-surface microlayer and water column*. Marine Chemistry, 2009. **115**(1-2): p. 1-9.
74. Ogbulie, T.E., J.N. Ogbulie, and I. Umezuruike, *Biodegradation of detergents by aquatic bacterial flora from Otamiri River, Nigeria*. African Journal of Biotechnology, 2008. **7**(6): p. 824-830.
75. Amirmozafari, N., et al., *Isolation and Identification of Anionic Surfactant Degrading Bacteria from Activated Sludge*. Iranian Biomedical Journal, 2007. **11**(2): p. 81-86.
76. Pattanathu, K.S.M.R. and E. Gakpe, *Production, Characterisation and Applications of Biosurfactants-Review*. Biotechnology, 2008. **7**(2): p. 360-370.
77. Koch, A.K., et al., *Hydrocarbon Assimilation and Biosurfactant Production in Pseudomonas aeruginosa Mutants*. Journal of Bacteriology, 1991: p. 4212-4219.
78. Walter, V., C. Syldatk, and R. Hausmann, *Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms*. Vol. 672. 2010, New York, NY, ETATS-UNIS: Springer Science+Business Media. 13.
79. Ruggeri, C., et al., *Isolation and characterisation of surface active compound-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated environments*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2009. **63**(7): p. 936-942.
80. Patel, M., *Surfactants Based on Renewable Raw Materials*. Journal of Industrial Ecology, 2003. **7**(3-4): p. 47-62.
81. Ron, E.Z. and E. Rosenberg, *Biosurfactants and oil bioremediation*. Current Opinion in Biotechnology, 2002. **13**(3): p. 249-252.

82. Banat, I.M., R.S. Makkar, and S.S. Cameotra, *Potential commercial applications of microbial surfactants*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000. **53**(5): p. 495-508.
83. Agogu e, H., et al., *Comparison of samplers for the biological characterization of the sea surface microlayer*. Limnol. Oceanogr., 2004. **2**: p. 213-225.
84. Agogu e, H., et al., *A survey on bacteria inhabiting the sea surface microlayer of coastal ecosystems*. FEMS Microbiology Ecology, 2005. **54**(2): p. 269-280.
85. Cunliffe, M., et al., *Phylogenetic and functional gene analysis of the bacterial and archaeal communities associated with the surface microlayer of an estuary*. ISME Journal, 2008. **2**: p. 776-789.
86. Franklin, M.P., et al., *Bacterial diversity in the bacterioneuston (sea surface microlayer): the bacterioneuston through the looking glass*. Environmental Microbiology, 2005. **7**(5): p. 723-736.
87. Gasparovic, B., et al., *Organic matter characterization in the sea surface microlayers in the subarctic Norwegian fjords region*. Marine Chemistry, 2007. **105**(1-2): p. 1-14.
88. Momzikoff, A., et al., *Field study of the chemical characterization of the upper ocean surface using various samplers*. Limnol. Oceanogr.: Methods, 2004. **2**(374-386).
89. Smith, R., *Neuston, Microlayers and Surface Films: Science at the Air-Water Interface*. Proceedings of Coastal Zone, 2007.
90. Obernosterer, I., et al., *Enhanced heterotrophic activity in the surface microlayer of the Mediterranean Sea*. Aquat Microb Ecol, 2005. **39**: p. 293-302.
91. Agogue, H., et al., *Resistance of marine bacterioneuston to solar radiation*. Vol. 71. 2005, Washington, DC, ETATS-UNIS: American Society for Microbiology. 8.
92. Coelho, F.J.R.C., et al., *PAH Degrading Bacteria in an Estuarine System, in Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry — Biological Responses to Contaminants*, N. Hamamura, et al., Editors. 2010, Terrapub. p. 77-87.
93. Guitart, C., et al., *Effect of the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sea surface microlayer on their coastal air-sea exchanges*. Journal of Marine Systems, 2010. **79**(1-2): p. 210-217.
94. Silva, J.d.J.F., *Circula o da  gua na Ria de Aveiro - Contribui o para o estudo da qualidade da  gua.*, in *Departamento de Ambiente e Ordenamento*. 1994, Universidade de Aveiro: Aveiro. p. 158.
95. Dias, J.M., J.F. Lopes, and I. Dekeyser, *Lagrangian transport of particles in Ria de Aveiro lagoon, Portugal*. Physics and Chemistry of the Earth, Part B: Hydrology, Oceans and Atmosphere, 2001. **26**(9): p. 721-727.
96. Lopes, J.F., J.M. Dias, and I. Dekeyser, *Numerical modelling of cohesive sediments transport in the Ria de Aveiro lagoon, Portugal*. Journal of Hydrology, 2006. **319**(1-4): p. 176-198.
97. Lopes, J.F. and C. Silva, *Temporal and spatial distribution of dissolved oxygen in the Ria de Aveiro lagoon*. Ecological Modelling, 2006. **197**(1-2): p. 67-88.

98. Henriques, I.S., et al., *Molecular sequence analysis of prokaryotic diversity in the middle and outer sections of the Portuguese estuary Ria de Aveiro*. FEMS Microbiology Ecology, 2004. **49**(2): p. 269-279.
99. de Souza, J.T., M. Mazzola, and J.M. Raaijmakers, *Conservation of the response regulator gene gacA in Pseudomonas species*. Environmental Microbiology, 2003. **5**(12): p. 1328-1340.
100. Gomes, N.C.M., et al., *Diversity of ndo Genes in Mangrove Sediments Exposed to Different Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Pollution*. Appl. Environ. Microbiol., 2007. **73**(22): p. 7392-7399.
101. Cébron, A., et al., *Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD[alpha]) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples*. Journal of Microbiological Methods, 2008. **73**(2): p. 148-159.
102. Iwai, S., et al., *Gene-targeted-metagenomics reveals extensive diversity of aromatic dioxygenase genes in the environment*. ISME J, 2009. **4**(2): p. 279-285.
103. Gomes, N.C.M., et al., *Effects of the inoculant strain Pseudomonas putida KT2442 (pNF142) and of naphthalene contamination on the soil bacterial community*. FEMS Microbiology Ecology, 2005. **54**(1): p. 21-33.
104. Smith, N.C., J. Hennessy, and D.E. Stead, *Repetitive Sequence-derived PCR Profiling Using the BOX-A1R Primer for Rapid Identification of the Plant Pathogen Clavibacter Michiganensis Subspecies Sepedonicus*. European Journal of Plant Pathology, 2001. **107**(7): p. 739-748.
105. Rademaker, J., et al., *Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: Xanthomonas as a model system*. Int J Syst Evol Microbiol, 2000. **50**(2): p. 665-677.
106. Weisburg, W.G., et al., *16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study*. J. Bacteriol., 1991. **173**: p. 697-703.
107. Burch, A.Y., et al., *Novel High-Throughput Detection Method To Assess Bacterial Surfactant Production*. Appl. Environ. Microbiol., 2010. **76**(16): p. 5363-5372.
108. Molina, M., et al., *Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium*. Biodegradation, 2009. **20**(6): p. 789-800.
109. Li, A.-h., et al., *Rhamnolipid Production by Pseudomonas Aeruginosa GIM 32 Using Different Substrates Including Molasses Distillery Wastewater*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010: p. 1-12.
110. Pavissich, J.P., et al., *Culture dependent and independent analyses of bacterial communities involved in copper plumbing corrosion*. Vol. 109. 2010, Oxford, ROYAUME-UNI: Blackwell. 12.
111. Edlund, A. and J.K. Jansson, *Use of bromodeoxyuridine immunocapture to identify psychrotolerant phenanthrene-degrading bacteria in phenanthrene-enriched polluted Baltic Sea sediments*. FEMS Microbiology Ecology, 2008. **65**(3): p. 513-525.
112. Ma, J., et al., *Isolation and characterization of PAHs degrading bacteria from activated sludge*. Journal of Biotechnology, 2008. **136**(Supplement 1): p. S697-S698.
113. Tapilatu, Y., et al., *Isolation of alkane-degrading bacteria from deep-sea Mediterranean sediments*. Letters in Applied Microbiology, 2010. **50**(2): p. 234-236.



114. Godfrey, S.A.C., J.W. Marshall, and J.D. Klena, *Genetic characterization of Pseudomonas 'NZ17' – a novel pathogen that results in a brown blotch disease of Agaricus bisporus*. Journal of Applied Microbiology, 2001. **91**(3): p. 412-420.
115. Lin, Q. and W. Jianlong, *Biodegradation characteristics of quinoline by Pseudomonas putida*. Bioresource Technology, 2010. **101**(19): p. 7683-7686.
116. Li, D., et al., *Antibiotic resistance characteristics of environmental bacteria from an oxytetracycline production wastewater treatment plant and the receiving river*. Appl. Environ. Microbiol., 2010: p. AEM.02964-09.
117. Tozum-Calgan, S.R.D. and N.Z. Atay-Guneyman, *The effects of an anionic and a non-ionic surfactant on growth and nitrogen fixing ability of a cyanobacterium, Gloeocapsa*. J Environ Sci Health Environ Sci Eng Part A, 1994. **29**: p. 355-370.
118. Mariani, L., et al., *The use of a test battery in marine ecotoxicology: The acute toxicity of sodium dodecyl sulfate*. Inc. Environ. Toxicol., 2006. **21**: p. 373-379.
119. Malik, A., P. Kimchhayarasy, and K. Kakii, *Effect of surfactants on stability of Acinetobacter johnsonii S35 and Oligotropha carboxidovorans S23 coaggregates* FEMS Microb. Ecol., 2005. **51**: p. 313-321.
120. Kozarac, Z., et al., *Reflection of light from the air/water interface covered with sea-surface microlayers*. Mar. Chem., 2005. **96**: p. 99-113.
121. Salter, I., et al., *Marine bacterioplankton can increase evaporation and gas transfer by metabolizing insoluble surfactants from the air-seawater interface*. FEMS Microbiol. Lett., 2009. **294**(2): p. 225-231.
122. Willumsen, P.A. and U. Karlson, *Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers*. Biodegradation, 1996. **7**(5): p. 415-423.
123. Mercadé, M.E., et al., *Screening and selection of surfactant-producing bacteria from waste lubricating oil*. Journal of Applied Microbiology, 1996. **81**(2): p. 161-166.
124. Youssef, N.H., et al., *Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms*. Journal of Microbiological Methods, 2004. **56**(3): p. 339-347.
125. Abalos, A., et al., *Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa AT10*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2002. **77**: p. 777-784.
126. Mutalik, S.R., et al., *Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from Rhodococcus spp. MTCC 2574*. Bioresource Technology, 2008. **99**(16): p. 7875-7880.
127. Huang, X.-F., et al., *Characterization and phylogenetic analysis of biodegradable-surfactant-producing bacteria*. Bioresource Technology, 2010. **101**: p. 317-323.
128. Gnanamani, A., et al., *Microbial biosurfactants and hydrolytic enzymes mediate in situ development of stable supra-molecular assemblies in fatty acids released from triglycerides*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. **78**(2): p. 200-207.

129. Abouseoud, M., et al., *Effect of pH and salinity on the emulsifying capacity and naphthalene solubility of a biosurfactant produced by Pseudomonas fluorescens*. Journal of Hazardous Materials, 2010. **180**(1-3): p. 131-136.
130. Guerra-Santos, L., O. Kappeli, and A. Fiechter, *Pseudomonas aeruginosa biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source*. Appl. Environ. Microbiol., 1984. **48**(2): p. 301-305.
131. Chen, C.-Y., S.C. Baker, and R.C. Darton, *The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources*. Journal of Microbiological Methods, 2007. **70**(3): p. 503-510.
132. Barbieri, P., et al., *Evolution of catabolic pathways and metabolic versatility in Pseudomonas stutzeri OX1*. Antonie van Leeuwenhoek, 2001. **79**(2): p. 135-140.
133. Barbieri, P., et al., *Alternative pathways for xylene degradation in Pseudomonas stutzeri strain*. Biodegradation, 1993. **4**(2): p. 71-80.
134. Uad, I., et al., *Biodegradative potential and characterization of bioemulsifiers of marine bacteria isolated from samples of seawater, sediment and fuel extracted at 4000 m of depth (Prestige wreck)*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2010. **64**(6): p. 511-518.
135. Barathi, S. and N. Vasudevan, *Utilization of petroleum hydrocarbons by Pseudomonas fluorescens isolated from a petroleum-contaminated soil*. Environment International, 2001. **26**(5-6): p. 413-416.
136. Kostal, J., et al., *Pseudomonas C12B, an SDS degrading strain, harbours a plasmid coding for degradation of medium chain length n-alkanes*. International Biodeterioration & Biodegradation, 1998. **42**(4): p. 221-228.
137. Hubert, C., Y. Shen, and G. Voordouw, *Composition of Toluene-Degrading Microbial Communities from Soil at Different Concentrations of Toluene*. Appl. Environ. Microbiol., 1999. **65**(7): p. 3064-3070.
138. Bazire, A., et al., *Osmotic stress and phosphate limitation alter production of cell-to-cell signal molecules and rhamnolipid biosurfactant by Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiology Letters, 2005. **253**: p. 125-131.
139. Rashedi, H., et al., *Isolation and production of biosurfactant from Pseudomonas aeruginosa isolated from Iranian southern wells oil*. Int. J. Environ. Sci.Tech., 2005. **2**(2): p. 121-127.
140. Husain, D.R., et al., *The effect of temperature on eicosane substrate uptake modes by a marine bacterium Pseudomonas nautica strain 617: relationship with the biochemical content of cells and supernatants*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1997. **13**(5): p. 587-590.
141. Thaniyavarn, J., et al., *Biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa A41 using palm oil as carbon source*. The Journal of General and Applied Microbiology, 2006. **52**(4): p. 215-222.
142. Janek, T., et al., *Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by Pseudomonas fluorescens BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard*. Bioresource Technology, 2010. **101**(15): p. 6118-6123.

143. Sahoo, S., et al., *Biosurfactant production from n-paraffins by an air isolate Pseudomonas aeruginosa OCD1*. J. Oleo Sci, 2010. **59**(11): p. 601-605.
144. Sayler, G.S., et al., *Catabolic plasmids of environmental and ecological significance*. Microbial Ecology, 1990. **19**(1): p. 1-20.
145. Primrose, S.B. and S.D. Ehrlich, *Isolation of plasmid deletion mutants and study of their instability*. Plasmid, 1981. **6**(2): p. 193-201.
146. Labandeira-Rey, M. and J.T. Skare, *Decreased Infectivity in Borrelia burgdorferi Strain B31 Is Associated with Loss of Linear Plasmid 25 or 28-1*. Infect. Immun., 2001. **69**(1): p. 446-455.
147. Pamp, S.J. and T. Tolker-Nielsen, *Multiple Roles of Biosurfactants in Structural Biofilm Development by Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 2007. **189**(6): p. 2531-2539.
148. Lequette, Y. and E.P. Greenberg, *Timing and Localization of Rhamnolipid Synthesis Gene Expression in Pseudomonas aeruginosa Biofilms*. J. Bacteriol., 2005. **187**(1): p. 37-44.
149. Nikaido, H., *Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2001. **12**(3): p. 215-223.