UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

MARCELA NUNES ARGENTIN

Produção de biossurfactante por uma linhagem termofílica de
Bacillus isolada de amostra rochosa de reservatório de petróleo

São Carlos

2016

MARCELA NUNES ARGENTIN

Produção de biossurfactante por uma linhagem termofílica de
Bacillus isolada de amostra rochosa de reservatório de petróleo

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestra em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador(a): Prof^a. Dr^a Nelma Regina
Segnini Bossolan

Versão Corrigida
(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Argentin, Marcela Nunes

Produção de biossurfactante por uma linhagem termofílica de *Bacillus* isolada de amostra rochosa de reservatório de petróleo / Marcela Nunes Argentin; orientadora Nelma Regina Segnini Bossolan - versão corrigida -- São Carlos, 2016.

123 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

1. *Bacillus alveayuensis*. 2. Termófilos. 3. Bioemulsificante. 4. Rocha reservatório. 5. MEOR. I. Bossolan, Nelma Regina Segnini, orient. II. Título.

*Aos meus pais,
Inês Nunes Argentin e Edson Argentin Focchi.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e toda a minha família pelo incentivo, carinho, compreensão e apoio em todos os momentos da minha vida.

Ao meu namorado Tiago por todo amor e companheirismo, você tornou este caminho mais fácil de ser percorrido.

À minha orientadora, Profa. Dra. Nelma Regina Segnini Bossolan pelo apoio, paciência e incentivo durante todas as horas em que precisei.

A todos os amigos que fiz no decorrer da graduação e no laboratório de Biofísica, muito obrigada pelos momentos de diversão, alegria e descontração que jamais serão esquecidos.

À Júlia Mara Martins por toda ajuda, atenção e ensinamentos no decorrer do projeto.

Ao Laboratório de Biofísica, Grupo Sérgio Mascarenhas e a ao Instituto de Física de São Carlos - USP pela infra-estrutura fundamental ao desenvolvimento deste trabalho. Às técnicas Andressa Alves Pinto e Derminda Isabel de Moraes pela ajuda nos momentos de dúvida.

À Profa. Dra. Márcia Nitschke e ao Grupo de Biotecnologia Microbiana, especialmente ao técnico João Pedro Lima pelas medidas de tensão superficial.

À Fundação de Apoio à Física e à Química, à Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) e à PETROBRAS S/A pelo apoio financeiro, e à PETROBRAS S/A pela disponibilização das amostras usadas no projeto.

Ao Centro de Pesquisas e Desenvolvimento da PETROBRAS (CENPES), em especial ao Luiz Fernando Martins, por todo auxílio e atenção dada durante este trabalho.

A todos os funcionários do Serviço de Pós-Graduação, Biblioteca, Gráfica e ao Setor de Informática-Sinfor do IFSC por serem sempre tão prestativos nos momentos de necessidade.

A todos vocês, meu MUITO OBRIGADA!

Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.

(Isaac Newton)

RESUMO

ARGENTIN, M. N. **Produção de biossurfactante por uma linhagem termofílica de *Bacillus* isolada de amostra rochosa de reservatório de petróleo.** 2016. 123p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Biossurfactantes (BS) são compostos tensoativos de baixo peso molecular produzidos por uma ampla variedade de microrganismos. Sua natureza anfipática faz com que esses compostos sejam capazes de reduzir a tensão superficial de líquidos ou formar emulsões estáveis, características que tornam os biossurfactantes altamente aplicáveis na indústria do petróleo. As condições extremas de reservatórios de petróleo quanto à temperatura e salinidade demandam estudos sobre a produção de biossurfactantes por linhagens bacterianas autóctones, bem como de sua estabilidade frente a estas condições. Neste contexto, este trabalho propôs a seleção de linhagens bacterianas produtoras de biossurfactante a partir de amostras rochosas de um reservatório localizado na Bacia de Campos (RJ), para possível aplicação em processos de recuperação de petróleo melhorada por microrganismos e/ou seus produtos ou *Microbial Enhancement Oil Recovery* (MEOR). Cultivos inoculados com as amostras rochosas foram usados para o isolamento das linhagens bacterianas. Os isolados positivos para produção de BS (avaliada pelo índice de emulsificação - E_{24}) foram identificados por meio do sequenciamento do gene rRNA 16S. Dez dos isolados obtidos apresentaram 99% de similaridade com *Bacillus alveayuensis*, sendo escolhido um deles - Ar70C7-2 - para estudos de avaliação da agitação, salinidade, fontes de carbono (C) e nitrogênio (N) e relação C/N no crescimento e produção de BS. O Meio Mineral adicionado de glicerina e NH_4Cl , na relação C/N=2, 70 g/L NaCl e incubado a 55°C forneceu o melhor resultado para o teste de E_{24} (69,1%). O BS produzido pelo isolado foi purificado parcialmente por precipitação ácida, obtendo-se, em média, 0,17g de extrato bruto (semi-purificado, SP) por litro de cultivo em Meio Mineral, e 0,24 g, em meio LB. O BS-SP produzido a partir dos cultivos nos meios LB modificado (BS-SP-LB) e Meio Mineral otimizado (BS-SP-MM) teve sua capacidade tensoativa testada frente às variações de pH, temperatura e salinidade. Ambos BS-SP apresentaram estabilidade térmica no intervalo de -18 a 121°C, registrando

valores médios de E_{24} de 65,4($\pm 2,5$)% e 63,7($\pm 0,6$)% (BS-SP-LB e BS-SP-MM, respectivamente) e de tensão superficial mínima de 43,3 mN/m (BS-SP-LB) e 42,1 mN/m (BS-SP-MM). Amostras de BS-SP tiveram seu pH ajustado para valores entre 2 a 12, apresentando valores médios de E_{24} de 66,4($\pm 3,4$)% e 60,1($\pm 3,2$)% (BS-SP-LB e BS-SP-MM, respectivamente) e de tensão superficial mínima de 44,3 mN/m (BS-SP-LB) e 42,1 mN/m (BS-SP-MM). Quanto à salinidade, as amostras foram ajustadas para concentrações no intervalo de 0 a 21% de NaCl, apresentando valores médios de E_{24} de 65,4($\pm 3,4$)% e 64,4($\pm 1,7$)% (BS-SP-LB e BS-SP-MM, respectivamente) e de tensão superficial mínima de 42,2 mN/m (BS-SP-LB) e 42,9mN/m (BS-SP-MM). Quanto à ação antimicrobiana, o BS-SP não apresentou atividade bactericida ou bacteriostática sobre as linhagens *E. coli*, *B. subtilis*, *P. fluorescens* e *S. epidermidis*. O BS produzido por Ar70C7-2, em condições de alta temperatura e salinidade, mostrou alto índice de emulsificação e estabilidade. Estas características, associadas à boa capacidade emulsificante sobre diversos substratos orgânicos, particularmente de derivados de petróleo, sugerem uma potencial aplicação em processos de MEOR.

Palavras-chave: *Bacillus alveayuensis*. Termófilos. Bioemulsificante. Rocha reservatório. MEOR.

ABSTRACT

ARGENTIN, M. N. **Production of biosurfactant by a thermophilic strain of *Bacillus* isolated from rock sample of an oil reservoir.** 2016. 123p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Biosurfactants (BS) are compounds of low molecular weight produced by a wide variety of microorganisms. Their amphipathic nature makes these compounds capable of reducing the surface tension of liquids and form stable emulsions, characteristics that make them highly applicable in the oil industry. The extreme conditions of temperature and salinity in oil reservoirs require research on the production of biosurfactants by indigenous bacteria, as well as its stability in these conditions. In this context, this work aimed the selection of biosurfactant-producing bacteria from rock samples of oil reservoir for potential use in microbial enhancement oil recovery (MEOR) processes. Cultures inoculated with rock samples were used for the isolation of bacterial strains. The positive isolates for biosurfactant production (measured by emulsification index - E_{24}) were identified by 16S rRNA gene sequencing. Ten of the obtained isolates showed 99% similarity to *Bacillus alveayuensis*, being chosen one - Ar70C7-2 - for essays evaluating factors such as agitation, salinity, carbon sources (C) and nitrogen (N) and C/N ratio on growth and BS production. The mineral medium (MM) with glycerine and NH_4Cl , at a C/N ratio equal to 2, temperature of 55 °C and 70 g/L NaCl, provided the best results for the E_{24} index (69.1%). The BS produced by strain Ar70C7-2 was partially purified by acid precipitation, yielding on average 0.17g of crude extract (semi-purified, SP) per liter of culture in MM, and 0.24 g in LB medium. The BS-SP produced both from LB (BS-SP-LB) and Mineral Medium cultures (BS-SP-MM) had its surface-active action evaluated in relation to changes in pH, temperature and salinity. Both BS-SP presented thermal stability in the range -18 to 121 °C, with E_{24} mean values of 65.4($\pm$ 2.5)% and 63.7($\pm$ 0.6)% (BS-SP-BL and BS-SP-MM, respectively) and minimal surface tension of 43.3 mN/m (BS-SP-BL) and 42.1 mN/m (BS-SP-MM). BS-SP samples were adjusted to pH values between 2 and 12, showing E_{24} mean values of 66.4($\pm$ 3.4)% e 60.1($\pm$ 3.2)% (BS-SP-BL and BS-SP-MM, respectively) and minimum surface tension of 44.3 mN/m (BS-SP-LB) and 42.1 mN/m (BS-SP-MM). Regarding

salinity, samples were adjusted to concentrations in the range 0 to 21% NaCl, showing E_{24} mean values $65.4(\pm 3.4)\%$ e $64.4(\pm 1.7)\%$ (BS-SP-BL and BS-SP-MM, respectively) and surface tension minimum of 42.2 mN/m (BS-SP-LB) and 42.9 mN/m (BS-SP-MM). As for antimicrobial action, the BS-SP showed no bactericidal or bacteriostatic activity on the strains *E. coli*, *B. subtilis*, *P. fluorescens* and *S. epidermidis*. The BS produced by Ar70C7-2 in thermophilic and halophilic conditions showed a high rate of emulsification and stability. These features, coupled with good emulsifying capacity on various organic substrates, particularly petroleum products, suggest a potential application in MEOR processes.

Keywords: *Bacillus alveayuensis*. Thermophiles. Bioemulsifier. Reservoir rock. MEOR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema simplificado da formação de um reservatório de petróleo.	24
Figura 2 -	Representação esquemática de uma molécula de surfactante.	33
Figura 3 -	Representação da distribuição de moléculas de surfactante em um sistema contendo uma única fase líquida. (a) Moléculas ocupando todas as interfaces líquido-ar e líquido-sólido. (b) Aumento da concentração do tensoativo solubilizado na fase líquida. (c) Formação de estrutura esférica mais estável. (d) Ilustração da organização das moléculas em uma micela esférica de tensoativo em meio aquoso, onde a parte apolar permanece isolada no interior da estrutura e a parte polar fica em contato com o líquido.	34
Figura 4 -	Estruturas da família lipopeptídeos e as suas isoformas. (a) Iturinas (b) Fengicinas.	40
Figura 5 -	Estruturas da família das surfactinas.....	42
Figura 6 -	Fluxograma representando as etapas experimentais realizadas nesse trabalho.	46
Figura 7 -	Cultivos-mãe recebidos do CENPES-PETROBRAS, mantidos no laboratório do Grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas (IFSC - USP).	48
Figura 8:	Instrumentos utilizados para retirar amostras de rocha dos perfis de rocha reservatório. Brocas do tipo serra copo de 25 ou 50 mm (a) foram acopladas a uma furadeira de bancada (b), com as quais foram feitas perfurações na face longitudinal de cada amostra (c) onde o cilindro representa uma amostra de rocha de reservatório.	48
Figura 9 -	Imagem representativa do código usado para a nomenclatura dos isolados.	51
Figura 10 -	Esquema da distribuição das soluções na microplaca usada no teste de sensibilidade a antibióticos. Na coluna 1 (C+) foram adicionados apenas o meio de cultura mais o inóculo bacteriano, sem os antibióticos (controles positivos). Nas colunas 11 e 12 (C-) foram adicionados apenas meio estéril (controles negativos). AMP: ampicilina, CAN: canamicina, CLR: cloranfenicol e VAN: vancomicina.	55
Figura 11 -	Colônias crescidas em meio sólido LB modificado, a partir dos cultivos líquidos em mesmo meio, inoculados com alíquotas dos cultivos-mãe. (a) Profundidade A, 35 g/L NaCl (b) Profundidade B, 35 g/L NaCl (c) Profundidade C, 35 g/L NaCl (d) Profundidade D, 35 g/L NaCl (e) Profundidade D, 70 g/L NaCl (f) Profundidade , 120 g/L NaCl.	64
Figura 12 -	Fotomicrografia de contraste de fase do isolado Ar70C7-2 com 1 dia de cultivo em meio LB modificado. Aumento de 1000x.	71

Figura 13 - Colônias crescidas em meio LB modificado após 7 dias de incubação a 55°C. (a) Imagem da placa de semeadura, aberta em fluxo laminar. (b) Observação das colônias por microscopia de campo claro (100x).....	71
Figura 14 - Fotomicrografia obtida por microscopia de campo claro do isolado Ar70C7-2, corado pela Técnica de Coloração Diferencial de Gram (1000x).....	72
Figura 15 - Fotomicrografias obtidas por microscopia de campo claro de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 (a) e <i>E. coli</i> ATCC 25922 (b), submetidos à Técnica de Coloração Diferencial de Gram (1000x).	72
Figura 16 - Resultado do teste de sensibilidade do isolado Ar70C7-2 aos antibióticos Ampicilina, Canamicina, Cloranfenicol e Vancomicina, avaliado pelo teste de microdiluição em caldo. Cada ponto corresponde à média da leitura da densidade óptica de 2 poços. Comparação do crescimento em meio LB modificado em diferentes concentrações.	74
Figura 17 - Índices médios de emulsificação E_{24} do biossurfactante produzido pelo isolado Ar70C7-2 em diferentes substratos orgânicos.....	76
Figura 18 - Crescimento e produção de biossurfactante por Ar70C7-2 nas condições sem agitação e a 200 rpm e meio com (a) 35 g/L de NaCl (b) 70 g/L de NaCl (c) 140 g/L de NaCl	77
Figura 19 - Resultados do Teste de Tukey para a análise da influência da salinidade na produção de biossurfactante do isolado Ar70C7	80
Figura 20 - Boxplot da evolução da produção de biossurfactante pelo isolado Ar70C7-2	81
Figura 21 - Resultados do teste do efeito da relação C/N sobre o desempenho do crescimento (medido pela densidade óptica) e da produção de biossurfactante (medido pelo teste E_{24}) pelo isolado Ar70C7-2.	84
Figura 22 - Resultados do teste do efeito da fonte de N sobre o desempenho do crescimento (medido pela densidade óptica) e da produção de biossurfactante (medido pelo teste E_{24}) pelo isolado Ar70C7-2.	86
Figura 23 - Resultados do Teste de Tukey para a análise da influência do tipo da fonte de Nitrogênio na produção de biossurfactante pelo isolado Ar70C7-2 com 72h de cultivo.	88
Figura 24 - Resultados do teste do efeito da fonte de C sobre o desempenho do crescimento (medido pela densidade óptica) e da produção de biossurfactante (medido pelo teste E_{24}) pelo isolado Ar70C7-2 após 72h de cultivo.	91
Figura 25 - Resultado do teste de Tukey para análise estatística da influência do tipo da fonte de Carbono na produção de biossurfactante pelo isolado Ar70C7-2 com 72h de cultivo.	92

Figura 26 - Fotos de etapas do processo de semi-purificação do biossurfactante obtido a partir do cultivo do isolado AR70C7-2. (a) Frasco com o precipitado formado após 12 horas da adição do HCl concentrado ao sobrenadante do cultivo em Meio Mineral otimizado. (b) Extrato bruto seco obtido a partir da liofilização do precipitado formado em (a).	95
Figura 27 - Teste de estabilidade frente a diferentes temperaturas feito com o biossurfactante semi-purificado obtido a partir de (a) meio LB modificado e (b) Meio Mineral. No gráfico estão representadas as médias obtidas para o índice de emulsificação E_{24} (%), em barras; as médias do diâmetro da gota, indicadas pelos pontos vermelhos; as médias da tensão superficial, indicadas pelos valores acima das barras.	97
Figura 28 - Teste de estabilidade frente a diferentes pHs feito com o biossurfactante semi-purificado obtido a partir de (a) meio LB modificado e (b) Meio Mineral. No gráfico estão representadas as médias obtidas para o índice de emulsificação E_{24} (%), em barras; as médias do diâmetro da gota, indicadas pelos pontos vermelhos; as médias do diâmetro da gota da solução-controle (água nos pHs avaliados), indicadas pelos pontos pretos; as médias da tensão superficial, indicadas pelos valores acima das barras.	99
Figura 29 - Teste de estabilidade frente a diferentes concentrações de NaCl feito com o biossurfactante semi-purificado obtido a partir de (a) meio LB modificado e (b) Meio Mineral. No gráfico estão representadas as médias obtidas para o índice de emulsificação E_{24} (%), em barras; as médias do diâmetro da gota, indicadas pelos pontos vermelhos; as médias do diâmetro da gota da solução-controle, indicadas pelos pontos pretos; as médias da tensão superficial, indicadas pelos valores acima das barras.	101
Figura 30 - Resultados do teste de disco-difusão para avaliação da ação antimicrobiana do biossurfactante semi-purificado em diferentes concentrações, frente às bactérias-teste. (a) <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922); (b) <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633); (c) <i>Pseudomonas fluorescens</i> (ATCC 13525) e (d) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228).	104
Figura 31 - Resultados do teste de disco-difusão para confirmação da sensibilidade das bactérias-teste frente aos antibióticos ampicilina, canamicina e vancomicina, em diferentes concentrações. (a) <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) com discos contendo ampicilina; (b) <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633) com discos contendo ampicilina; (c) <i>Pseudomonas fluorescens</i> (ATCC 13525) com discos contendo canamicina e (d) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228) com discos contendo vancomicina.	105
Figura 32 - Resultados do teste de diluição em caldo para avaliação da ação antimicrobiana do biossurfactante semi-purificado em diferentes concentrações, frente às bactérias-teste. (a) <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633); (b) <i>Escherichia coli</i> (ATCC	

25922); (c) <i>Pseudomonas fluorescens</i> (ATCC 13525) e (d) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228).....	107
---	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classes de biossurfactantes e alguns de seus microrganismos produtores.....	36
Tabela 2 - Cultivos em meio LB modificado que resultaram no isolamento de colônias em meio sólido. + (houve crescimento de colônias), - (não houve crescimento de colônias).	63
Tabela 3 - Resultados do teste de emulsificação E_{24} apresentados pelos 38 isolados selecionados a partir dos cultivos líquidos que tiveram como inóculo alíquotas do repique dos cultivos-mãe.	66
Tabela 4 - Resultado da análise do sequenciamento do gene RNAr 16S para os isolados selecionados após a triagem para produção de biossurfactantes, que apresentaram resultados com valores acima de 10% no teste de E_{24}	67
Tabela 5 - Tabela ANOVA para os valores do índice de emulsificação E_{24} (%) com os dados obtidos no tempo 192h dos cultivos nas três salinidades testadas.	79
Tabela 6 - Tabela ANOVA feita com os valores do índice de emulsificação E_{24} (%) registrados no tempo 72h, em todas as condições testadas.	87
Tabela 7 - Tabela ANOVA feita com os valores do índice de emulsificação E_{24} (%) registrados no tempo 72h nos cultivos com as diferentes fontes de C testadas.	92
Tabela 8 - Comparação das condições ótimas de cultivo entre o isolado Ar70C7-2 e diferentes microrganismos do gênero <i>Bacillus</i> descritos na literatura.	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ala	Alanina
AMP	Ampicilina
Asp	Ácido Aspártico
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
BS	Biossurfactante
BS-SP	Biossurfactante semi-purificado
C/N	Relação Carbono / Nitrogênio
CAN	Canamicina
CENPES	Centro de Pesquisas e Desenvolvimento da PETROBRAS
CEOR	Chemical Enhanced Oil Recovery
CLR	Cloranfenicol
CMC	Concentração Micelar Crítica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
E ₂₄	Índice de Emulsificação após 24h
EL	Extrato de Levedura
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EOR	Enhanced Oil Recovery
EPS	Polímeros Extracelulares
Gln	Glutamina
Glu	Ácido Glutâmico
IFSC-USP	Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo
Ile	Isoleucina
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucina
MEOR	Microbial Enhanced Oil Recovery
MH	Ágar Mueller-Hinton
M-H	Caldo Mueller-Hinton
MM	Meio Mineral
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Orn	Ornitina
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
PETROBRAS S/A	Petróleo Brasileiro S/A
Pro	Prolina
RJ	Rio de Janeiro
RPM	Rotações por minuto
Thr	Treonina

Tyr

Val

VAN

Tirosina

Valina

Vancomicina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Contexto.....	23
1.2	Comunidades microbianas de reservatório de petróleo.....	23
1.3	Processos de recuperação de petróleo em reservatórios.....	30
1.4	Moléculas tensoativas.....	32
1.4.1	<i>Surfactantes.....</i>	<i>32</i>
1.4.2	<i>Biossurfactantes.....</i>	<i>34</i>
1.4.3	<i>Aplicação dos biossurfactantes</i>	<i>37</i>
1.4.4	<i>Produção de biossurfactante pelo gênero Bacillus.....</i>	<i>39</i>
2	OBJETIVOS	43
3	MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1	Cultivos-mãe	46
3.2	Isolamento de bactérias aeróbias a partir dos cultivos-mãe.	49
3.3	Triagem dos isolados bacterianos para a produção de biossurfactante.....	50
3.3.1	<i>Nomenclatura adotada para os isolados</i>	<i>51</i>
3.4	Preparo e manutenção das culturas-estoque dos isolados	52
3.5	Identificação e caracterização dos isolados	52
3.5.1	<i>Identificação dos isolados pelo sequenciamento do gene de DNAr 16S</i>	<i>52</i>
3.5.2	<i>Identificação pela coloração diferencial de Gram.....</i>	<i>53</i>
3.5.3	<i>Teste de sensibilidade a antibióticos.....</i>	<i>54</i>
3.6	Avaliação da capacidade emulsificante sobre diferentes substratos orgânicos	55
3.7	Ensaio de crescimento e produção de biossurfactante realizados com o isolado selecionado	55
3.7.1	<i>Efeito da agitação e salinidade</i>	<i>56</i>
3.7.2	<i>Efeito das fontes de Nitrogênio e Carbono e da relação C/N.....</i>	<i>57</i>
3.8	Semi-purificação do biossurfactante produzido pelo isolado selecionado.....	58
3.9	Testes de estabilidade do biossurfactante semi-purificado.....	59
3.10	Avaliação da ação antimicrobiana do biossurfactante semi-purificado	61
3.11	Análise estatística dos dados coletados.....	62
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63

4.1	Isolamento, triagem e caracterização dos isolados bacterianos produtores de biossurfactante	63
4.2	Caracterização morfológica e bioquímica do isolado selecionado.....	70
4.2.1	<i>Teste de sensibilidade a antibióticos com o isolado Ar70C7-2</i>	72
4.3	Avaliação da capacidade emulsificante sobre diferentes substratos orgânicos	75
4.4	Ensaio de crescimento e produção de biossurfactante realizados com o isolado Ar70C7-2.....	76
4.5	Efeito das fontes de Nitrogênio e Carbono e da relação C/N.....	81
4.6	Teste de estabilidade do biossurfactante semi-purificado	95
4.7	Avaliação da ação antimicrobiana do biossurfactante semi-purificado.....	103
5	CONCLUSÕES	109
6	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	111
	REFERÊNCIAS.....	113

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contexto

O presente trabalho faz parte de um projeto intitulado “Prospecção de linhagens bacterianas produtoras de surfactantes e de enzimas do grupo lipase/esterase em reservatórios de petróleo”, desenvolvido na forma de um Termo de Cooperação entre o Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP) e a PETROBRAS S/A, coordenado pela Profa. Nelma R. S. Bossolan. Este projeto tem como objetivos a busca de linhagens bacterianas produtoras de biossurfactantes a partir de amostras de óleo e rocha oriundas de reservatórios de petróleo localizados no litoral da região sudeste do Brasil, bem como a pesquisa de enzimas do grupo esterase e lipase em genomas de bactérias isoladas deste tipo de ambiente. O isolamento de linhagens termofílicas e halofílicas produtoras de biossurfactantes, bem como o uso de formas ativas e estáveis das enzimas citadas em altas temperaturas, poderão abrir rotas competitivas para suas aplicações na indústria do petróleo.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo geral a seleção e cultivo de linhagens bacterianas produtoras de biossurfactante a partir de amostras de rocha de reservatório de petróleo, com vistas à aplicação em processos de recuperação terciária de petróleo.

De modo a se compreender a importância do estudo de linhagens bacterianas isoladas de reservatórios de petróleo bem como suas aplicações em processos de recuperação de óleo, nesta introdução serão abordados os aspectos da microbiologia do petróleo e das condições de produção de biossurfactantes por bactérias.

1.2 Comunidades microbianas de reservatório de petróleo

Antes de tratar dos microrganismos presentes em reservatórios, convém fazer uma breve descrição da estrutura de um reservatório de petróleo, que é um sistema composto por quatro elementos: rocha geradora, rocha reservatório, rocha selante (ou capeadora) e trapas (ou armadilhas) (figura 1). Além das rochas, dois fenômenos geológicos (migração e sincronismo) devem estar presentes.¹

que ocorra a acumulação de óleo ou gás. Elas são capazes de manter o petróleo retido após sua formação e migração, impedindo que ele extravase para a superfície.

A rocha reservatório, composta geralmente por arenito e rocha calcária, é aquela cujas características de porosidade e permeabilidade possibilitam o armazenamento do fluido, além de promover a rota de migração do mesmo. Os fluidos são acomodados na seguinte distribuição: camada superior de gás, camada de óleo intermediária e uma capa de água salgada inferior, chamada de água de formação.^{1,3-4}

Os fluídos presentes no interior das trapas devem encontrar um sistema impermeável que os impeça de extravasar, essa situação é provida pelas rochas selantes. Estas permanecem acima das rochas reservatório que, devido a sua granulometria fina, faz com que haja uma acumulação petrolífera. Entretanto as rochas geradoras, reservatórios, selantes, trapa e migração devem ocorrer em uma escala temporal adequada para que haja a formação do reservatório, esse fenômeno é denominado como sincronismo. Desta maneira, após iniciada a geração de óleo nas bacias sedimentares, o petróleo deve ser expulso da rocha geradora e encontrar uma rota de migração adequada bem como um reservatório que contenha rochas selantes para que haja sua deposição.^{1,3}

O petróleo é uma substância oleosa e inflamável, com densidade inferior à água. É formado por uma mistura complexa de hidrocarbonetos (saturados e aromáticos) e, em quantidades menores, de derivados orgânicos sulfurados, nitrogenados, oxigenados e organo-metálicos. Sua composição elementar, em peso, é majoritariamente de carbono (80 - 90%) e hidrogênio (10 - 15%), mas também são encontrados enxofre (até 5%), oxigênio (até 4%), nitrogênio (até 2%) e traços de íons metálicos (níquel e vanádio)⁴. O petróleo pode ser classificado, segundo os teores de hidrocarbonetos nele presentes, nos tipos: alcanos ou parafínicos, cicloalcanos ou naftênicos e hidrocarbonetos aromáticos. Cada tipo reflete a origem de formação, as condições térmicas de sua criação e os processos de biodegradação ocasionados por microrganismos.³ Magot e colaboradores⁵ elencam as características físico-químicas dos reservatórios de petróleo que dão suporte à presença de microrganismos em tais ambientes. Os autores destacam a temperatura como fator limitante para o crescimento de tais microrganismos nos reservatórios, já que a temperatura aumenta a uma taxa de 3 °C a cada 100 metros de profundidade,

chegando a atingir uma faixa de 130 a 150 °C nestes locais. Essa faixa de temperatura é aceita como o limite teórico para o crescimento microbiano pois, embora ainda não se saiba a verdadeira temperatura limite para que a vida se sustente, ela é provavelmente limitada pela estabilidade das moléculas biológicas.⁶ Philippi,⁷ porém, constatou a ausência de biodegradação em reservatórios cuja temperatura ultrapassava 82 °C, o que poderia indicar uma temperatura limite mais baixa para que haja a presença de microrganismos nos reservatórios. Além da temperatura, o pH e a salinidade das águas de formação podem limitar o crescimento microbiano. A salinidade pode variar em um intervalo de 0,5 a 36% e o pH de 3 até 7. Já a pressão nos reservatórios não é considerada como um fator que impeça o desenvolvimento das bactérias *in situ*, mesmo que ela possa chegar até 500 atm.⁵

Os processos metabólicos que ocorrem nos campos de petróleo são influenciados pelos aceptores de elétrons ali presentes. O oxigênio dissolvido não está presente mesmo naqueles reservatórios rasos que podem ser alcançados por água meteórica (água de chuva), sendo o sulfato e o carbonato os aceptores mais comumente encontrados nas águas de formação. Já os doadores de elétrons encontrados incluem o hidrogênio, ácidos graxos voláteis como acetato, propionato e benzoato e os hidrocarbonetos presentes no petróleo. Dessa forma, pode-se supor que os principais processos metabólicos encontrados nestes ambientes são a redução de sulfato, metanogênese e a fermentação.^{5,8-9}

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são procariotos estritamente anaeróbios extensamente encontrados em ambientes anóxicos, onde são capazes de utilizar o sulfato comoceptor final de elétrons para a degradação de compostos orgânicos, produzindo sulfeto. Esse, por sua vez, pode ser oxidado por bactérias quimiolitotróficas (aeróbias) ou fototróficas (anaeróbias). Até 2008, as linhagens procariotas de BRS estavam distribuídas em cinco táxons de Bacteria e dois de Archaea. A maioria das BRS pertencia a 23 gêneros pertencentes à classe Deltaproteobacteria, seguido pelas BRS gram-positivas pertencentes à classe Clostridia.¹⁰

As BRS são particularmente importantes na indústria de petróleo pois estão associadas a um grave problema denominado de acidificação ou *souring*. Com a injeção de água do mar, os níveis de sulfato, nitrogênio e fósforo nos reservatórios aumentam, bem como ocorre a redução na temperatura; assim, o ambiente torna-se

favorável para o crescimento das BRS, e, como resultado, há produção de gás sulfídrico (H_2S) e de minerais sulfurosos. O gás, por ser altamente reativo, corrosivo e tóxico, está associado à degradação das tubulações e estruturas de plataformas, já os minerais promovem o entupimento dos reservatórios por se acumularem nas tubulações. Este fenômeno eleva os custos do refinamento e aumenta os riscos da saúde humana por conta da toxicidade do H_2S .⁹⁻¹⁰

Procariotos metanogênicos são microrganismos intrínsecos aos poços de petróleo, sendo relatados pela primeira vez por Kuznetsov em 1950.¹¹ A metanogênese é um processo onde há produção de gás metano (CH_4) a partir da metabolização de hidrogênio, CO_2 , acetato, metilamina e dimetilsulfeto. Os microrganismos metanogênicos são distribuídos em cinco ordens de Archaea - Methanomicrobiales, Methanobacteriales, Methanococcales, Methanosarcinales e Methanopyrales. O isolamento de metanogênicos tem sido bem sucedido em reservatórios com temperaturas mais amenas, na faixa de crescimento para mesófilos, sendo associados com a biodegradação do óleo presente nesses ambientes. Metanogênicos termofílicos também foram isolados de reservatórios de petróleo, sendo a maioria hidrogenotróficos, incluindo membros dos gêneros *Methanobacterium*, *Metanothermobacter*, *Methanoculleus*, *Methanococcus* e *Metanothermococcus*.⁹

Microrganismos fermentadores mesófilos, termófilos e hipertermófilos fazem parte da microbiota presente em reservatórios de petróleo. Essas bactérias são capazes de obter energia através da fosforilação de uma vasta gama de compostos orgânicos, entre eles, açúcares, peptídeos, aminoácidos ou ácidos orgânicos, sendo que alguns deles podem usar o enxofre elementar, tiosulfato, íon férrico e nitrato como aceptores de elétrons para oxidação dos substratos. Junto com sua capacidade termofílica, esses microrganismos também podem se desenvolver em um intervalo de salinidade amplo, sendo, portanto, habitantes comuns em poços de petróleo.¹² Dentre as bactérias fermentadoras termofílicas recuperadas a partir de amostras de água/óleo de reservatório de petróleo, uma grande parte pertence ou ao filo Thermotogae ou à ordem Thermoanaerobacteriales (classe Clostridia, filo Firmicutes).⁹

Embora alguns autores afirmem que as comunidades autóctones de poços de petróleo sejam formadas somente por microrganismos anaeróbios,¹³⁻¹⁴ a literatura também registra a detecção de microrganismos aeróbios, anaeróbios facultativos e

microaerófilos em amostras de reservatórios de óleo, mesmo com a limitação de oxigênio nos poços¹⁵⁻¹⁸ e até a associação entre aeróbios e anaeróbios na degradação do petróleo.¹⁹ A presença de microrganismos aeróbios pode ser explicada devido à contaminação externa durante a coleta direta das amostras bem como a possível entrada de água da superfície durante a mesma, o que dificulta muitas vezes a interpretação da presença de bactérias aeróbicas nesses ecossistemas anaeróbios. No entanto, Magot⁵ sugere que o conhecimento sobre esse ecossistema ainda é limitado e, portanto, não se pode excluir ou indicar com confiança que os microrganismos aeróbios são somente contaminantes exógenos.

Com base no cenário acima, iremos destacar alguns trabalhos mais recentes que abordam a caracterização da comunidade microbiana de reservatórios de petróleo na busca de compreensão dos papéis metabólicos desempenhados pelas bactérias autóctones bem como a aplicação direta deste conhecimento em processos de interesse da indústria do petróleo. É importante destacar que grande parte dos estudos de caracterização microbiana de reservatórios tem sido feita a partir de amostras de óleo e de fluidos produzidos coletados nas saídas dos poços de produção. Os estudos feitos a partir de amostras de rocha do reservatório são poucos devido à complexidade e alto custo de obtenção das amostras.⁸

Um grupo de pesquisadores brasileiros,²⁰ utilizaram amostras de rochas de um reservatório da Bacia de Campos coletadas em profundidades entre 2.822 a 2.828 metros, evidenciaram a presença dos gêneros *Variovorax* e *Rubrivivax*, relatados como degradadores de hidrocarbonetos. Algumas cepas também foram relacionadas como membros dos gêneros *Comamonas*, *Delftia* e *Azoarcus*, associadas a processos de biorremediação. Além disso, foram identificados também membros dos gêneros *Methylobacterium* e *Rhodopseudomonas*, considerados como degradadores de compostos aromáticos.

Korenblum e colaboradores²¹ realizaram estudo em amostras das águas de injeção de três plataformas de petróleo *offshore* da Bacia de Campos (RJ), com o objetivo de determinar a comunidade microbiana ali presente por meio de métodos moleculares, bem como correlacionar sua presença ao tratamento feito a estas águas antes de injetá-las nos reservatórios. Espécies relacionadas aos processos de acidificação e corrosão foram identificadas, sendo que poderiam estar ativas no reservatório e no sistema de tubulação, mesmo após o tratamento das águas de injeção com biocidas.

Em uma revisão feita sobre a acidificação dos reservatórios, Gieg e colaboradores²² destacam o tratamento dos reservatórios com nitrato e nitrito para controlar esse processo e inibir a sulfetogênese microbiana devido a sua facilidade de transporte nas formações petrolíferas. A caracterização das espécies redutoras de sulfatos e nitratos presentes nesses reservatórios implicaria em escolhas adequadas para o controle destes processos.

Ren e colaboradores²³ analisaram a microbiota da água de injeção do reservatório bem como de dois poços de produção adjacentes com profundidade entre 1.173 e 1.230 metros, localizados em Gudao, na China. O objetivo do trabalho foi verificar como a comunidade microbiana presente no reservatório era afetada pelos microrganismos injetados. Os pesquisadores evidenciaram que os microrganismos presentes nos poços de produção e aqueles presentes na água de injeção não possuíam relação significativa, assim como as comunidades microbianas de ambos os poços eram diferentes. Os autores propuseram que essa disparidade poderia ser ocasionada pela diferença na temperatura entre os poços de produção (69,5 °C) e a água de injeção (40 - 50 °C), bem como nas concentrações de oxigênio dissolvido e disponibilidade de nutrientes. Além disso, os autores identificaram um grande número de sequências analisadas com identidade inferior a 97%, se comparadas com as sequências de referência no banco de dados utilizado, demonstrando, assim, um grande número de microrganismos inexplorados no reservatório.

Nazina e colaboradores²⁴ estudaram a diversidade, atividade geoquímica e o potencial biotecnológico dos microrganismos presentes em um reservatório carbonático em Tatarstan, na Rússia, visando à recuperação de petróleo. A comunidade microbiana continha poucos microrganismos aeróbios, predominando as bactérias redutoras de sulfato e fermentadoras; a análise do gene do rRNA 16S identificou também a presença das bactérias desnitrificantes *Sulfurimonas* e *Thauera*. Os pesquisadores indicaram como adequada a associação da recuperação tradicional do petróleo com o estímulo do crescimento microbiano *in situ*, através da adição de melaço de cana como fonte de carbono em conjunto com altas concentrações de nitrato para supressão das bactérias redutoras de sulfato.

Piubeli e colaboradores²⁵ estudaram e caracterizaram a comunidade microbiana presente na água de produção hipersalina da Bacia de Campos para verificar o potencial de remoção de contaminantes tóxicos pelas espécies ali

presentes. Os autores, por meio da análise por 16S rRNA, observaram a presença de microrganismos metanogênicos halotolerantes mesófilos pertencentes aos gêneros *Methanosaeta* e *Methanoplanus*. Também foram encontrados representantes dos gêneros *Marinobacter* e *Halomonas*, conhecidos como degradadores de hidrocarbonetos e os gêneros anaeróbios *Desulfuromonas*, *Acetobacterium* e *Kosmotoga*.

A comunidade microbiana associada ao MEOR (*Microbial Enhanced Oil Recovery*) e sua abundância em água de injeção no reservatório de Xinjiang Luliang foram investigadas por Gao e colaboradores.²⁶ A análise do gene do rRNA 16S revelou que este reservatório abrigava uma grande variedade de microrganismos, dentre eles *Halomonas*, *Marinobacter*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, todos com potencial para crescer usando hidrocarbonetos como fonte de carbono. Também apresentou redutores de nitrato e redutores de sulfato bem como microrganismos metanogênicos. Os autores concluíram, a partir dos resultados, uma abundante população microbiana associada à recuperação de petróleo, sugerindo alto potencial para aplicação de MEOR.

1.3 Processos de recuperação de petróleo em reservatórios

O processo de extração e recuperação de petróleo pode ser dividido em três etapas. Na recuperação primária, a produção do reservatório é proveniente de mecanismos naturais. A pressão interna do poço muitas vezes é mais elevada se comparada à pressão externa, e assim, quando o poço é perfurado, o óleo e o gás contidos no reservatório fluem livremente até a superfície. À medida que o óleo é escoado, a pressão interna torna-se insuficiente para forçar o óleo à superfície, sendo então necessário o fornecimento de energia externa para que o reservatório continue a produzir. A recuperação secundária consiste na injeção de fluidos para se aumentar novamente a pressão interna e, conseqüentemente, o escoamento de óleo.^{3,9}

A inserção de água é o método mais comum e mais barato de recuperação secundária, onde o líquido é bombeado para dentro do reservatório através do poço de injeção e força o óleo a fluir para a superfície, no poço de produção. A natureza heterogênea da formação dos reservatórios reduz a eficiência da remoção durante esse processo. As forças de capilaridade no interior das rochas fazem com que a

água escorra através do caminho de menor resistência, deixando grandes áreas do reservatório ainda contendo óleo, em locais onde o tamanho do poro ou a estrutura da rocha torna mais difícil a fluidez da água.²⁷ Utilizados estes dois modos de recuperação, ainda podem permanecer presos no reservatório cerca de dois terços do óleo.²⁸ Essa baixa produtividade ocorre devido (a) à elevada viscosidade do óleo que limita a sua mobilidade, (b) à alta tensão superficial entre o óleo e os fluidos aquosos e (c) também à baixa permeabilidade do reservatório.⁹

A terceira etapa do processo de recuperação, conhecida como EOR (*Enhanced Oil Recovery*), visa a extração desse óleo residual restante no reservatório. O processo de EOR abrange os métodos térmicos (injeção de vapor, água quente ou combustão interna), injeção de gás miscível, injeção de químicos (adição de polímeros, surfactantes ou agentes alcalinos) e injeção de células ou produtos microbianos. Na recuperação térmica, calor é introduzido no reservatório para diminuir a viscosidade e vaporizar o óleo. Já a adição de gás miscível permite a redução da tensão interfacial entre o óleo e o fluido injetado, sendo o CO₂ um exemplo. O dióxido de carbono induz um efeito de “inchaço” ao se dissolver no óleo o que diminui sua viscosidade, ocasionando a redução das forças capilares e interfaciais, permitindo o deslocamento do óleo dentro do reservatório. O método químico de extração terciária, também conhecido como CEOR (*Chemical Enhanced Oil Recovery*), compreende o uso de agentes e processos químicos para a extração do óleo, alterando suas características. Os surfactantes são usados para reduzir a tensão interfacial entre óleo-água e óleo-rocha, diminuindo as forças capilares que retêm o óleo preso à rocha. Como esses compostos são muitas vezes produtos petroquímicos, o processo se torna caro e danoso ao meio ambiente, gerando resíduos de difícil remoção e degradação.^{3,29} A técnica de MEOR, discutida inicialmente por Beckman em 1926,³⁰ propõe o uso de microrganismos e/ou os biossurfactantes por eles produzidos para extrair o óleo residual. Essa prática é uma alternativa aos métodos clássicos descritos acima, uma vez que é menos agressiva ao meio ambiente, mais rentável e pode fazer uso da microbiota já existente nos reservatórios. Os biossurfactantes atuam, também, na emulsificação do petróleo, tornando mais fácil a separação entre os filmes de óleo e as rochas.³¹

A técnica de MEOR pode ser aplicada de três formas. A primeira envolve a injeção de microrganismos produtores de tensoativos nos reservatórios, com sua subsequente propagação e posterior produção de biossurfactante *in situ*. A segunda

estratégia trata da adição de nutrientes previamente selecionados nos poços para favorecer o crescimento de microrganismos autóctones produtores de biossurfactante. Por fim, o terceiro mecanismo envolve a produção de biossurfactantes em biorreatores *ex situ* com sua posterior injeção nos reservatórios.³²

Durante o processo para a recuperação de óleo por MEOR, os microrganismos são expostos a extremos de pH, temperatura e salinidade, condições estas típicas de reservatórios, sendo, por isso, necessário o estudo da comunidade microbiana presente nos poços de petróleo, bem como o contínuo isolamento de microrganismos capazes de se desenvolverem nesses ambientes.³³

1.4 Moléculas tensoativas

1.4.1 Surfactantes

Banat e colaboradores³¹ definem surfactantes como moléculas anfifílicas sendo constituídas por uma parte hidrofóbica e uma parte hidrofílica (figura 2). O domínio apolar é geralmente formado por uma cadeia hidrocarbonada, já o domínio polar é composto por certos átomos que possuem concentração de carga, com formação de um pólo negativo ou positivo. Quando a região polar apresenta carga negativa, a molécula é denominada de tensoativo aniônico; estes constituem a maior classe de tensoativos usada pela indústria em geral e nela se encontram os sabonetes, sabões, xampus e detergentes. Já as moléculas que apresentam carga positiva na região polar são chamadas de tensoativos catiônicos; estes, por sua vez, exibem pouca representatividade industrial pois apresentam alta toxicidade aquática. Os tensoativos que não apresentam cargas verdadeiras, ou seja, não possuem sua origem em sais dissociados, são denominados tensoativos não iônicos, configurando a segunda maior classe de tensoativos usados industrialmente. E, por fim, existe ainda uma última classe de surfactantes conhecidos como anfóteros, os quais podem se comportar como aniônicos ou catiônicos, caráter que vai depender do pH da solução em que este se encontra, sendo estes pouco usados no mercado devido ao seu alto custo de produção.³⁴

Figura 2 - Representação esquemática de uma molécula de surfactante.
Fonte: Elaborada pela autora.

Sua natureza anfipática faz com que esses compostos sejam capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial nas interfaces entre líquidos, sólidos e gases, facilitando a homogeneização entre fases com diferentes graus de polaridade. Essa característica adéqua os surfactantes a diferentes aplicações industriais que podem envolver emulsificação, detergência, molhabilidade, capacidade espumante, de dispersão de fases e de solubilização.³⁵

Ao ser adicionado em um sistema contendo uma única fase líquida, o surfactante passa a ocupar as interfaces líquido-ar e líquido-sólido até que não haja mais espaço livre nessas superfícies (figura 3a). A partir desse momento, se mais surfactante for adicionado ao sistema, a concentração do tensoativo solubilizado no líquido irá aumentar (figura 3b). Supondo uma solução aquosa, as moléculas de surfactante irão se agrupar de forma a se tornar uma estrutura globular mais estável, denominada micela (figura 3c e 3d). Essa concentração na qual todas as superfícies estão saturadas é uma característica físico-química intrínseca à molécula de surfactante, sendo essa concentração definida de concentração micelar crítica (CMC).³⁴

Uma característica importante observada nos tensoativos de origem microbiana (que serão tratados no próximo item) é que eles são mais eficazes se comparados com os tensoativos convencionais (surfactantes aniônicos sulfatados) uma vez que apresentam tensão superficial inferior em menor concentração se comparado com os surfactantes químicos.³⁵

Figura 3 -Representação da distribuição de moléculas de surfactante em um sistema contendo uma única fase líquida. (a) Moléculas ocupando todas as interfaces líquido-ar e líquido-sólido. (b) Aumento da concentração do tensoativo solubilizado na fase líquida. (c) Formação de estrutura esférica mais estável. (d) Ilustração da organização das moléculas em uma micela esférica de tensoativo em meio aquoso, onde a parte apolar permanece isolada no interior da estrutura e a parte polar fica em contato com o líquido.

Fonte: Adaptada de DALTIN³⁴

1.4.2 Biossurfactantes

Os surfactantes produzidos por microrganismos, sejam eles eucariotos (algas e fungos) ou procariotos (Domínios Bacteria e Archaea), são denominados de biossurfactantes e são formados principalmente por polímeros extracelulares (EPS) excretados pelas células, sendo considerados como subprodutos de seus sistemas metabólicos.³⁶ Ron e Rosenberg³⁷ elencam algumas possíveis funções fisiológicas dos biossurfactantes para suas espécies produtoras, dentre as quais destacamos: aumentar a solubilidade de compostos insolúveis em água; atuação como fatores de virulência; ação antimicrobiana; regulação das propriedades da superfície celular para adesão ou desprendimento de superfícies.

Os biossurfactantes são estruturalmente diversos e podem ser reunidos em cinco principais classes de moléculas: glicolipídeos; lipopeptídeos e lipoproteínas; ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídeos; surfactantes poliméricos e surfactantes particulados.³³

Os glicolipídeos, biossurfactantes mais estudados, são compostos por uma unidade de carboidrato ligada a uma cauda hidrofóbica constituída por cadeias alifáticas de ácidos graxos. Lipopeptídeos e lipoproteínas possuem, em sua molécula, um domínio hidrofílico formado por um peptídeo associado a um domínio lipídico, possuindo conhecida atividade antimicrobiana. Os fosfolipídeos, lipídios neutros e ácidos graxos e biossurfactantes particulados estão presentes em membranas de microrganismos, ajudando na emulsificação e captura de hidrocarbonetos. Já os tensoativos poliméricos possuem alta viscosidade e alto peso molecular em decorrência de suas grandes cadeias de carboidratos e proteínas, podendo conter porções lipídicas.^{32,38} Exemplos de biossurfactantes bem como de seus microrganismos produtores encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 - Classes de biossurfactantes e alguns de seus microrganismos produtores.

Classes de biossurfactantes	Exemplos	Microrganismos produtores
Glicolipídeos	Trehalolipídeos	<i>Mycobacterium</i> sp. <i>Nocardia</i> sp. <i>Rhodococcus</i> sp. <i>Corynebacterium</i> sp.
	Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas</i> sp.
	Soforolipídeos	<i>Torulopsis</i> sp. <i>Wickerhamiella domericqiae</i>
	Manosileritritol	<i>Candida</i> sp. <i>Psdozyma</i> sp.
Lipopeptídeos	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
	Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
	Fengicina	<i>Bacillus subtilis</i>
	Iturina	<i>Bacillus subtilis</i>
	Liquenisina	<i>Bacillus licheniformis</i>
	Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
	Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, Lipídios neutros e Fosfolipídeos	Ácidos graxos	<i>Corynebacterium</i> sp. <i>Arthobacter</i> sp.
	Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
	Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Surfactantes particulados	Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ,

Fonte: NITSCHKE; PASTORE³⁵; DAS et. al.³⁹; MUKHERJEE; DAS.³²

A produção de biossurfactante por um microrganismo é influenciada por diversos fatores, dentre os quais se destacam a disponibilidade de nutrientes e a presença de elementos traços.³⁸ Khire⁴⁰ indica as fontes de carbono, nitrogênio e a relação entre elas como tendo papel primordial no tipo, na qualidade e na

quantidade de biossurfactantes produzidos pelos microrganismos cultivados. Santa Anna e colaboradores⁴¹ estudaram a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, bem como a razão C/N entre elas, na produção de tensoativo pela linhagem *Pseudomonas aeruginosa* PA1. O valor máximo do ramnolípídeo estudado foi de 3,16 g/L para o meio contendo glicerol e nitrato de sódio na proporção de 60/1. Outros nutrientes como o ferro⁴² e o manganês⁴³ também foram relatados como tendo papel fundamental no aumento da síntese de surfactina em linhagens de *B. subtilis*.

O uso de fontes de carbono de baixo custo tem sido avaliado em estudos de produção de biossurfactante por espécies bacterianas, com vistas à redução de custos no uso destes tensoativos em processos industriais. Os substratos alternativos testados incluem restos de batata processada,⁴⁴ melaço de cana-de-açúcar,⁴⁵ água residual da produção de farinha de mandioca⁴⁶ e glicerol bruto (subproduto do biodiesel),⁴⁷ entre outros.

1.4.3 Aplicação dos biossurfactantes

Alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, atividade em extremos de temperatura, pH e salinidade, maior variedade estrutural, bem como a sua possível produção a partir da fermentação de resíduos industriais são características que diferenciam os biossurfactantes dos tensoativos quimicamente produzidos, tornando-os comercialmente promissores.⁴⁸⁻⁴⁹ Suas características singulares sugerem uma vasta aplicação na indústria petrolífera, podendo ser incorporados na composição de óleos lubrificantes, na biorremediação e dispersão em derramamentos de petróleo, remoção de resíduos em tanques de estoque, bem como nos processos de MEOR. Jinfeng e colaboradores⁵⁰ realizaram um teste-piloto em campo introduzindo uma suspensão de nutrientes e células de uma linhagem de *Bacillus* em um reservatório termofílico localizado na China. Os autores monitoraram a tensão superficial da água de produção e o volume de petróleo produzido durante alguns meses após dez injeções programadas da suspensão e observaram uma redução na tensão superficial da água de produção bem com um aumento na recuperação de óleo, associando com a produção de biossurfactante pelo microrganismo introduzido e também pelos nativos. Youssef e colaboradores⁵¹ realizaram estudo semelhante de estímulo de produção de biossurfactante *in situ* em

um reservatório estadunidense, verificando um aumento na recuperação de petróleo após a injeção de uma suspensão contendo solução salina, glicose e células de duas linhagens de *Bacillus*. Os autores também concluíram, por meio de cálculos baseado no preço do barril de petróleo, que o aumento no volume de óleo produzido por esta tecnologia compensa o custo da mesma.

Além da aplicação na indústria petrolífera, os biossurfactantes podem ser explorados por diferentes setores, como por exemplo, na indústria de tintas, farmacêutica, cosméticos, alimentos e de processamento de papel e celulose.³⁵ Na agricultura, os tensoativos são usados como agentes dispersantes na formulação de herbicidas e pesticidas, já que seus compostos ativos são geralmente hidrofóbicos.⁵² Alguns lipopeptídeos são potentes antifúngicos que podem ser usados como biopesticidas para proteção das plantas.⁵³⁻⁵⁵ Os biossurfactantes também podem ser usados para a hidrofilição de solos argilosos para que fertilizantes e pesticidas sejam igualmente distribuídos.³¹

Os tensoativos são utilizados, pela indústria alimentícia, na formação de emulsões, as quais possuem um papel importante dando consistência, textura, solubilizando aromas, além de atuar na dispersão de fases. São usados também no processo de panificação e em produtos derivados da carne, onde influenciam nas características reológicas da farinha e na emulsificação de gorduras, bem como no aumento do tempo de prateleira de produtos a base de amido. O emulsificante produzido por *Candida utilis* é usado em molhos prontos para saladas.^{31,35} Os biossurfactantes, nos últimos anos, têm se destacado como moléculas promissoras e versáteis com grandes possibilidades para aplicação terapêutica. Suas atividades antiadesivas, antivirais, antifúngicas, antitumorais e antibacterianas amplamente descritas na literatura^{31,35,56-57} tornam essas moléculas potenciais agentes terapêuticos alternativos aos medicamentos sintéticos. Além das propriedades antimicrobianas, a surfactina é conhecida por inibir a formação de coágulos, induzir a formação de canais iônicos em bicamadas lipídicas e inibir a adenosina monofosfato cíclico.⁵⁸ Em decorrência de sua boa compatibilidade com a pele, os biossurfactantes podem ser usados em produtos de higiene e cosméticos. Devido a sua capacidade umectante, alguns soforolipídeos fazem parte da formulação de maquiagens e de cremes faciais. Além disso, alguns tensoativos podem ser usados na indústria de tintas, aumentando sua espalhabilidade; na mineração, durante o

processo de flotação e separação de calcita e eschelita, bem como na solubilização de carvão.³¹

1.4.4 Produção de biossurfactante pelo gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* é amplamente estudado com relação à produção de biossurfactantes, geralmente lipopeptídeos. Entretanto, existem exceções relatadas, como o *Bacillus megaterium* que produz um glicolípídeo⁵⁹ e a linhagem *Bacillus subtilis* 22BN que produz um ramnolípídeo.⁶⁰

Os lipopeptídeos mais comumente produzidos pelo gênero *Bacillus* são iturinas, fengicinas, liquenisinas e surfactinas. Os compostos de iturina (figura 4a) são caracterizados pela presença de sete aminoácidos cíclicos ligados a uma cadeia de ácido graxo β -amino. Esse grupo apresenta oito isoformas (iturinas A, A_L e C, micosubtilisina, bacilopeptina e bacilomicinas D, F e L) todas com grande potencial antifúngico, atuando também como biopesticida. Já as fengicinas (figura 4b) apresentam-se em quatro isoformas, as quais são formadas por um lipodecapeptídeo ligado a um ácido graxo β -hidróxi de cadeia variável entre 11 e 14 átomos de carbono;⁶¹ também apresenta ação antifúngica.⁶²⁻⁶³ Pathak e Keharia⁶⁴ isolaram a linhagem de *B. subtilis* K1 a partir de raízes aéreas de uma planta da espécie *Ficus benghalensis*. Esse microrganismo produziu uma mistura de surfactinas, iturinas e fengicinas com alta atividade emulsificante. A atividade da mistura de tensoativos permaneceu estável após ser mantida a 100 °C por 2h, no intervalo de pH 6-12 e em concentrações de NaCl de até 10%. Também apresentou bons resultados em teste com meio poroso, onde conseguiu recuperar aproximadamente 43% do óleo, sugerindo possível aplicabilidade em MEOR.

Figura 4 -Estruturas da família lipopeptídeos e as suas isoformas. (a) Iturinas (b) Fengicinas.
 Fonte: Adaptada de INÈS; DHOUHA.⁶¹

Liquenisina e surfactina (figura 5) são considerados como os tensoativos mais efetivos conhecidos atualmente, sendo capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m. A liquenisina, produzida por *B. licheniformis*, é caracterizada por conter uma longa cadeia de ácido graxo β-hidróxi ligado a um lipopeptídeo cíclico aniônico, apresentando-se nas isoformas liquenisina A, B, C, D,

G e surfactante BL86. Além de ser capaz de reduzir a tensão superficial, também é altamente estável, quando submetida a temperaturas acima de 50 °C, a altas variações de pH (4,5 - 9) e altas concentrações de NaCl e Ca^{2+} , demonstrando assim sua potencial aplicação em processos de MEOR.⁶²⁻⁶³ Yakimov e colaboradores⁶⁵ relataram o alto potencial de quatro linhagens de *Bacillus licheniformis* para a recuperação de petróleo *in situ*. Os microrganismos foram isolados de reservatórios de petróleo com profundidades variando entre 866 a 1.520 metros, situados no norte da Alemanha. Todos os isolados foram capazes de crescer em aerobiose e anaerobiose em temperatura ótima de 50 °C com concentrações de NaCl variando entre 5 e 10%, condições essas promissoras para sua aplicação no processo de recuperação avançada de petróleo.

Já surfactina é formada por um heptapeptídeo, cuja sequência de aminoácidos L-Glu, L-Leu, D-Leu, L-Val, L-Asp, D-Leu, L-Leu está ligada por uma ligação lactônica a uma cadeia de ácido graxo β -hidróxi, que pode variar entre 12 e 16 átomos de carbono.⁶² Makkar e Cameotra⁶⁶ estudaram uma linhagem de *B. subtilis* capaz de produzir biossurfactante em condições termofílicas e em altas concentrações de NaCl. O tensoativo produzido, de natureza lipopeptídica e semelhante à surfactina, permaneceu estável após ser aquecido a 100 °C durante duas horas em diferentes valores de pH (4,5 - 10,5). Além disso, em teste com meio poroso, conseguiu recuperar mais de 60% do óleo, demonstrando capacidade de ser utilizado em MEOR.

Variedades

Esperina	L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu-COOH
Lichenisina	L-XL ₁ -L-XL ₂ -D-Leu-L-XL ₄ -L-Asp-D-Leu-L-XL ₇
Pumilacidina	L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Leu-L-Asp-D-Leu-L-XP ₇
Surfactina	L-Glu-L-XS ₂ -D-Leu-L-XS ₄ -L-Asp-D-Leu-L-XS ₇

Onde: XL₁ = Gln ou Glu; XL₂ = Leu ou Ile; XL₄ e XL₇ = Val ou Ile; XP₇ = Val ou Ile;
XS₂ = Val, Leu ou Ile; XS₄ = Ala, Leu ou Ile; XS₇ = Val, Leu ou Ile.

Figura 5 - Estruturas da família das surfactinas.

Fonte: Adaptada de INÈS; DHOUHA.⁶¹

Sakthipriya e colaboradores⁶⁷ estudaram a produção de biossurfactante por uma linhagem termofílica de *Bacillus subtilis* usando diferentes hidrocarbonetos como substratos. A produção máxima de tensoativo ocorreu em 50 °C na presença de n-hexadecano como fonte de carbono; os pesquisadores também concluíram que as propriedades físico-químicas do BS produzido reduziam conforme a cadeia do hidrocarboneto aumentava. O biossurfactante identificado como surfactina apresentou alta estabilidade em alta temperatura (120 °C), salinidade (10%) e variações de pH (8-14), indicando potencial uso na recuperação avançada de petróleo.

Alvarez e colaboradores⁶⁸ observaram a produção de emulsificantes por *Bacillus amyloliquefaciens*, isolado a partir de amostras ambientais contaminadas com petróleo bruto ou derivados. O agente emulsificante, identificado como surfactina, foi produzido em temperaturas de até 50 °C, em salinidades variadas (0,5 a 7%) e pH entre 6 a 9, com capacidade de reduzir a tensão superficial do meio de cultivo para 28,5 mN/m e de produzir camadas de emulsificação (E₂₄) de até 63%, características que o torna adequado ao uso em reservatórios de petróleo.

2 OBJETIVOS

Considerando (a) a importância do isolamento de espécies bacterianas produtoras de biossurfactantes a partir de amostras de reservatório, particularmente de rochas, cujo acesso é mais restrito devido às limitações de sua coleta, e (b) o potencial de aplicação dos biossurfactantes produzidos por estas bactérias para os processos de recuperação terciária do petróleo, bem como para o uso em outras áreas industriais, o presente trabalho propôs como objetivos específicos:

- O isolamento e a seleção de linhagens bacterianas produtoras de surfactantes a partir de cultivos tendo rocha de reservatório como inóculo.
- A identificação do(s) isolado(s) por meio do sequenciamento do gene codificante do rRNA16S.
- A verificação das condições ótimas de cultivo de um dos isolados (meio de cultura, temperatura, salinidade, agitação, fonte de nitrogênio, fonte de carbono, relação C/N) para a produção de biossurfactante.
- Avaliar a estabilidade do biossurfactante produzido pelo isolado selecionado quanto aos parâmetros temperatura, salinidade e pH.
- Avaliar a ação antibacteriana do biossurfactante produzido pelo isolado selecionado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O isolamento de bactérias produtoras de biossurfactantes pretendido neste trabalho foi feito a partir de cultivos inoculados com rocha particulada de reservatório recebidos do CENPES - Centro de Pesquisas e Desenvolvimento da PETROBRAS, em 28 de junho de 2013. Estes cultivos serão denominados adiante como cultivos-mãe.

O planejamento experimental para o isolamento e cultivos das linhagens bacterianas pretendidas, bem como para a verificação das condições de produção de biossurfactante por um dos isolados obtidos, envolveu as seguintes etapas: (a) isolamento de bactérias aeróbias em meio sólido, a partir dos cultivos-mãe; (b) triagem qualitativa dos isolados para a produção de biossurfactante; (c) identificação dos isolados selecionados; (d) acompanhamento do crescimento e produção de biossurfactante por um isolado selecionado, variando-se algumas condições de cultivo, como agitação, salinidade e fontes de carbono e nitrogênio do meio de cultura, relação C/N do meio de cultura; (e) purificação parcial do biossurfactante produzido pelo isolado selecionado; (f) avaliação da estabilidade do biossurfactante semi-purificado frente às variações de temperatura, salinidade e pH; (g) avaliação da ação antimicrobiana do biossurfactante semi-purificado.

A figura 6 mostra um fluxograma das etapas experimentais realizadas, com a indicação do tópico no qual cada etapa será descrita.

Figura 6 - Fluxograma representando as etapas experimentais realizadas nesse trabalho.
Fonte: Elaborada pela autora.

3.1 Cultivos-mãe

A equipe técnica da Gerência de Biotecnologia do CENPES-PETROBRAS enviou ao nosso laboratório 12 frascos de cultivos aeróbios inoculados com alíquotas de rocha de reservatório (figura 7) em meio LB (Luria-Bertani) modificado, descrito adiante. As amostras de rochas foram obtidas durante a perfuração de um reservatório carbonático provenientes de quatro perfis cilíndricos de rocha, de cerca

de 20 centímetros cada, coletados cada um em uma profundidade diferente no intervalo de 3.000 a 3.100 metros, com temperatura *in situ* de 80 °C, situado a cerca de 130 km da costa do Rio de Janeiro, no pós-sal da Bacia de Campos. As profundidades serão referidas, daqui em diante, pelas letras A, B, C e D, em ordem crescente de profundidade.

Imediatamente após a abertura da coluna de perfuração, as amostras foram limpas com papel embebido em álcool 70°, embaladas em papel craft estéril e armazenadas a 4 °C até seu processamento. Devido à rigidez do material rochoso, bem como ao excesso de material particulado, a ruptura das amostras não pode ser efetuada em câmara de anaerobiose, optando-se pela perfuração com brocas do tipo serra copo (com 25 e 50 mm de diâmetro) (figura 8a), diamantadas nas extremidades, acopladas a uma furadeira de bancada (figura 8b). Esta abordagem propiciou maior segurança e precisão na retirada das amostras, além de permitir que a velocidade de trabalho fosse variada conforme a necessidade.

Para realizar a perfuração das amostras, todas as ferramentas (serra copo, espátulas e copo griffin) foram limpas com sabão neutro e esterilizadas em autoclave por 15 minutos a 121 °C. Cada perfuração foi efetuada no centro da face longitudinal de cada perfil (figura 8c), desprezando-se os primeiros centímetros para prevenir que houvesse coleta de material atingido pelo fluido de perfuração. Deve ser ressaltado que a própria pressão interna do reservatório impediu que o fluido de perfuração avançasse mais do que um (1) centímetro internamente na rocha (observação realizada em campo). Após cada perfuração, a alíquota obtida de rocha era retirada da serra copo, disposta em saco plástico estéril e mantida em jarra de anaerobiose a 4 °C até seu processamento e inoculação em frascos contendo meio de cultura.

Figura 7 - Cultivos-mãe recebidos do CENPES-PETROBRAS, mantidos no laboratório do Grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas (IFSC - USP).

Fonte: Elaborada pela autora.

(a)

(b)

(c)

Figura 8 - Instrumentos utilizados para retirar amostras de rocha dos perfis de rocha reservatório.

Brocas do tipo serra copo de 25 ou 50 mm (a) foram acopladas a uma furadeira de bancada (b), com as quais foram feitas perfurações na face longitudinal de cada amostra (c) onde o cilindro representa uma amostra de rocha de reservatório

Fonte: Imagens cedidas por CENPES-PETROBRAS.

Os cultivos-mãe foram preparados em frascos de vidro do tipo penicilina, com volume total de 50 mL, e contendo 25 mL de meio adicionados de cerca de 10 g de rocha triturada. Os cultivos, à época do recebimento, tinham entre 42 e 45 dias de incubação e foram mantidos à temperatura de 55 °C, desde o inóculo.

O meio LB, que tem em sua composição original (em g/L) triptona (10), extrato de levedura (5) e cloreto de sódio (5),⁶⁹ foi modificado no intuito de adequá-lo às condições de reservatório. O meio foi preparado com água do mar sintética, adicionado de solução de elementos-traço e teve a salinidade final desejada ajustada com NaCl.

A água do mar sintética foi composta de (em g/L): NaF (0,003), $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,02), H_3BO_3 (0,03), KBr (0,1), KCl (0,7), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,113), Na_2SO_4 (4,0), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10,78), NaCl (23,5), $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0,02), Na_4EDTA (0,001), NaHCO_3 (0,2), com pH ajustado para $8,0 \pm (0,5)$ (Luiz Fernando Martins-CENPES/PETROBRAS, comunicação pessoal). Os meios de cultura foram preparados com três salinidades finais, ajustadas com NaCl: 35, 70 e 120 g/L. Os cultivos com salinidade maior ou igual a 70 g/L foram suplementados com solução de elementos-traço, de composição (mg/L): H_3BO_3 (60), CoCl_2 (120), CuCl_2 (15), MnCl_2 (100), ZnCl_2 (70), NiCl_2 (20), Na_2MoO_4 (25) e Na_2SeO_3 (3). Essa solução foi preparada separadamente, esterilizada por filtração usando membrana de celulose regenerada 0,22 μm (Millipore[®]), adicionada em frasco estéril e armazenada a 4 °C.

3.2 Isolamento de bactérias aeróbias a partir dos cultivos-mãe.

O isolamento de bactérias aeróbias dos cultivos-mãe foi feito pelo método de espalhamento de alíquota em meio sólido. O meio utilizado foi o LB modificado, adicionado de agarose como agente solidificante, na concentração de 2%. A agarose foi utilizada em substituição ao ágar bacteriológico pois a primeira mantém-se homogênea, sem formação de grumos, quando incubada em alta temperatura e em meio com alta salinidade. Uma alíquota de 0,1 mL dos cultivos-mãe foi espalhada no meio sólido, com auxílio de uma alça de Drigalski, e as placas foram mantidas por 7 dias em estufa bacteriológica na temperatura de 55 °C.

Em virtude da ausência de crescimento em meio sólido e da verificação de baixa densidade celular dos cultivos-mãe, como observado nas análises microscópicas, novos cultivos em meio líquido foram feitos, utilizando-se alíquotas do cultivo-mãe como inóculos. O meio utilizado nos novos cultivos líquidos foi o LB modificado, de igual composição ao dos cultivos-mãe, nas três salinidades (35, 70 e 120 g/L). Quarenta e cinco (45) mL de meio foram dispensados em cada frasco de vidro tipo Schott-Duran de volume total de 100 mL e esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos. Alíquotas de 5 mL do cultivo-mãe foram adicionados aos meios estéreis, em uma concentração final de 10% (v/v), e incubados em estufa bacteriológica a 55 °C por 7 dias. O crescimento bacteriano foi acompanhado por turbidez aparente e também confirmado por análises em microscopia de contraste

de fase em microscópio Olympus modelo BX53, devido à interferência das partículas de rocha nas medidas de turbidez por espectrometria.

Dos frascos que apresentaram crescimento, foram retiradas alíquotas para semeadura em meio sólido LB modificado, preparado como descrito acima. Um volume de 0,1 mL da amostra diluída (1:10, 1:100 ou 1:1.000) foi aplicada sobre o meio e espalhada com a alça de Drigalski. As placas foram mantidas por 7 dias em estufa bacteriológica na temperatura de 55 °C. As colônias crescidas em cada placa foram selecionadas para a etapa posterior de triagem para a produção de biossurfactante, conforme descrito no próximo item.

3.3 Triagem dos isolados bacterianos para a produção de biossurfactante

A partir do crescimento em meio sólido, pelo menos duas colônias de cada placa foram selecionadas para serem isoladas. Com auxílio de uma alça de transferência, uma massa de crescimento de cada colônia foi ressuspensa em 15 mL de meio estéril LB modificado, acondicionado em frasco do tipo penicilina de 30 mL. As salinidades do meio foram ajustadas de acordo com seu respectivo cultivo de origem. Os frascos foram fechados com tampa de borracha, vedados com parafilme e incubados a 55 °C em estufa bacteriológica, por 7 dias.

As linhagens bacterianas isoladas foram testadas para a produção de biossurfactante por meio do teste de emulsificação E_{24} (índice de emulsificação após 24 horas). O teste de emulsificação E_{24} , descrito por Cooper e Goldenberg,⁷⁰ avalia a estabilidade e altura da camada de emulsão formada a partir do contato de dois líquidos com diferentes graus de polaridade, neste caso, o querosene e a amostra desejada.

Um volume de 2 mL de cada cultivo de 7 dias, previamente separado das células por centrifugação a 7.000 rpm por 30 minutos, foi adicionado em um tubo de ensaio (13x100 mm) já contendo o mesmo volume de querosene. Esse tubo foi submetido à agitação vigorosa (*vortex*) por 2 minutos, após o qual permaneceu em repouso por 24 horas à temperatura ambiente (25 °C). A altura da camada de emulsificação juntamente com a altura total do conteúdo presente no tubo foram medidas e partir delas o índice de emulsificação foi calculado: a altura da camada de emulsão foi dividida pela altura total e o valor resultante foi multiplicado por 100, para expressar o resultado em porcentagem. Todos os isolados que apresentaram

um índice E_{24} de pelo menos 10% foram selecionados para a etapa seguinte de identificação pelo sequenciamento do gene de DNAr 16S. Para aqueles isolados cujo resultado de E_{24} foi negativo ou inferior a 10%, o teste E_{24} foi repetido, porém desta vez usando o extrato celular lisado do cultivo de cada isolado.

A lise celular foi necessária para se avaliar a presença de biossurfactante não excretado pela célula. Nesse processo, o *pellet* resultante da centrifugação de uma alíquota de 2 mL do cultivo de 7 dias foi lavado por três vezes com tampão fosfato, cuja composição é (g/L): Na_2HPO_4 (21,3), NaCl (8,7); em pH ajustado para 7 a partir da adição de KH_2PO_4 em pó. Após as lavagens, o *pellet* resultante foi ressuspendido em um volume de 5 mL de tampão fosfato, sendo submetido ao ultrassom, por 10 minutos, com amplitude de 15% com pulsos intercalados a cada 10 segundos. Após este processo, o extrato celular foi submetido à centrifugação (30 minutos a 7.000 rpm) e o *pellet* obtido foi novamente ressuspendido em 2 mL de tampão fosfato. Essa suspensão foi usada para a medição do índice de emulsificação (E_{24}), conforme descrito acima.

3.3.1 Nomenclatura adotada para os isolados

As linhagens bacterianas obtidas no processo de isolamento foram nomeadas com a indicação da origem (Ar - cultivo com rocha Aruanã), salinidade do meio (35, 70 ou 120 g/L NaCl), profundidade da rocha amostrada (A, B, C ou D) e o número da colônia na placa, gerando um código, como exemplificado na figura 9.

Figura 9 - Imagem representativa do código usado para a nomenclatura dos isolados.
Fonte: Elaborada pela autora.

3.4 Preparo e manutenção das culturas-estoque dos isolados

O método utilizado para preservar as culturas-estoque dos isolados foi a criopreservação, descrito a seguir.

Alíquotas de 200 µL de uma cultura na fase logarítmica de crescimento foram colocadas em tubos estéreis de 0,5 mL do tipo *Eppendorf*, seguido da adição de 89µL de uma solução estéril de glicerol a 65%. Os tubos foram rapidamente mergulhados em nitrogênio líquido e, após o congelamento, foram mantidos em *ultra-freezer* a -80 °C (procedimento adaptado de Brumano et al.).⁷¹ Para cada isolado foram armazenadas doze (12) réplicas. As amostras criopreservadas foram periodicamente ressuspensas em meio líquido fresco, para confirmação de sua viabilidade e pureza, acompanhadas de análises microscópicas. Lâminas previamente limpas e cobertas com uma fina camada de ágar 1,5% a 2% estéril receberam as alíquotas dos cultivos a serem analisados e foram recobertas por lamínula. As observações foram feitas em aumento de 1.000 a 2.000X, em microscópio de contraste de fase Olympus modelo BX53, conectado a uma câmera para captura de imagens, analisadas pelo *software* CellSens Digital Image Standard.

3.5 Identificação e caracterização dos isolados

3.5.1 Identificação dos isolados pelo sequenciamento do gene de DNAr 16S

A identificação dos isolados obtidos foi feita a partir da técnica de sequenciamento do gene codificante do RNAr 16S. Uma alíquota de 4µL de DNA do cultivo selecionado, previamente fervido, foi utilizado como molde para amplificação por PCR, tendo como alvo o fragmento de 16S RNAr. Para isso, foi usado um par de iniciadores específicos para o Domínio Bacteria (27f e 1492r).⁷² Em seguida, o produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose para purificação dos fragmentos com o kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System – Promega, seguindo as instruções do fabricante. Os fragmentos purificados do gene 16S RNAr foram ligados ao vetor pTZ57R/T (InsTAclone® PCR Cloning Kit – Fermentas), seguindo os passos descritos no manual do fabricante, sendo inseridos em células competentes de *E. coli* de linhagem DH5α por choque térmico. As colônias

transformadas foram isoladas a partir do cultivo em meio LB sólido (2% de ágar) contendo carbenicilina (concentração final 100 mg/L), sendo que as colônias selecionadas como recombinantes foram cultivadas em meio LB líquido, na presença de ampicilina na concentração final de 100 mg/L. O DNA plasmideal foi extraído desse crescimento pelo método de lise alcalina (adaptado de Sambrook et al.)⁷³

O DNA plasmideal extraído foi preparado com o kit Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing e os iniciadores universais M13forward e M13reverse⁷³ (em tubos separados), e sequenciados em um sequenciador automático (3130 Genetic Analyzer – Applied Biosystems). As sequências obtidas foram analisadas no programa Codon Code Aligner (Codon Code Corporation) e somente o intervalo com índice de qualidade (Phred/Phrap) maior ou igual a 20 de cada uma foi submetido ao banco de dados GenBank do NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para uma análise preliminar de identificação do microrganismo mais semelhante.

3.5.2 Identificação pela coloração diferencial de Gram

O método de coloração diferencial de Gram foi feito usando-se duas linhagens controle - *B. subtilis* ATCC 6633 e *E. coli* ATCC 25922 - e o isolado selecionado para estudo. Em uma lâmina limpa adicionou-se uma alíquota de um cultivo em fase *log* de crescimento, que foi transferida e espalhada sobre a lâmina com o auxílio de uma alça de transferência esterilizada em chama. Após completa secagem, a parte inferior da lâmina foi passada três vezes pela chama do bico de Bunsen para fixação das células. O esfregaço foi coberto com Solução de Cristal Violeta (0,25%) durante 1 minuto e lavado em água corrente, seguido de mais um minuto completamente coberto com solução de lugol. O excesso de lugol foi retirado e a lâmina foi lavada com etanol 95% P.A. até remoção do excesso de corante. Em seguida a lâmina foi contracorada com solução de safranina (0,01%) por 1 minuto, lavada novamente em água corrente e posta para secar à temperatura ambiente. Após o preparo, a lâmina foi observada em microscopia de campo claro no microscópio Olympus-BX53 no aumento de 1.000X.

3.5.3 Teste de sensibilidade a antibióticos

Um isolado selecionado foi testado quanto à sensibilidade a quatro antibióticos - ampicilina (AMP), canamicina (CAN), cloranfenicol (CLR) e vancomicina (VAN) – por meio do método de microdiluição em caldo, baseado em Oliveira e colaboradores⁷⁴ e Andrews.⁷⁵ Aliquotas de 10 µL de diluições seriadas dos antibióticos selecionados foram distribuídas em uma microplaca do tipo ELISA, de fundo chato, com 96 poços, como mostrado na figura 10. As diluições foram preparadas a partir de uma solução-estoque de cada antibiótico, na concentração de 20mg/mL, previamente esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm (exceto cloranfenicol, por ser preparado em etanol 80%). As concentrações testadas dos antibióticos variaram de 0,01 a 2000 µg/mL. Em cada poço com antibiótico foi adicionado um volume de 285 µL de Caldo Mueller-Hinton (M-H), acrescentado de 15 µL de um cultivo em fase logarítmica da bactéria a ser testada, a placa foi mantida a 55 °C. A composição do caldo M-H, em g/L, é: hidrolisado ácido de caseína (17,5), extrato de carne (3), amido (1,5), tendo pH ajustado para 7,3±(0,1).⁶⁹ Após o período de incubação a leitura da densidade óptica para avaliar o crescimento microbiano foi feita em espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 Microplate Reader, com leitor de placas de 96 poços, a 600 nm. O preparo dos cultivos das bactérias testadas bem como de seus pré-inóculos foram feitos como descrito a seguir. Uma porção de crescimento bacteriano da cultura-estoque foi retirada da placa, com a ajuda de uma alça de inoculação estéril, e semeada em um tubo de ensaio com 5 mL de meio LB modificado (70g/L NaCl) e incubado a 55 °C sem agitação, por 12 horas. Este tubo foi denominado pré-inóculo I. Passado este período, todo o volume contido no pré-inóculo I (5 mL) foi adicionado a um frasco do tipo Schott-Duran contendo 95 mL do mesmo meio, e incubado a 55 °C, em agitação de 200 rpm, até que fosse atingido a densidade óptica de 0,5 da escala nefelométrica de Mc Farland. Este frasco foi denominado pré-inóculo II. Em seguida, 15mL de pré-inóculo II foi adicionado em 285 mL de meio LB modificado (ajustado com a salinidade a ser testada), de modo a se manter uma concentração final do inóculo de 5%(v/v).

Figura 10 - Esquema da distribuição das soluções na microplaca usada no teste de sensibilidade a antibióticos. Na coluna 1 (C+) foram adicionados apenas o meio de cultura mais o inóculo bacteriano, sem os antibióticos (controles positivos). Nas colunas 11 e 12 (C-) foram adicionados apenas meio estéril (controles negativos). AMP: ampicilina, CAN: canamicina, CLR: cloranfenicol e VAN: vancomicina.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.6 Avaliação da capacidade emulsificante sobre diferentes substratos orgânicos

Um teste de emulsificação usando-se substratos hidrofóbicos foi feito no intuito de se verificar a atividade do biossurfactante na presença de diferentes substâncias hidrofóbicas. A escolha dos substratos testados baseou-se no fato destes compostos serem candidatos à degradação e/ou emulsificação em processos de biorremediação ambiental ou no processo de MEOR.⁷⁶

O inóculo do isolado selecionado foi preparado como descrito no item 3.5.3 e o cultivo foi mantido a 55 °C por sete dias. O índice de emulsificação foi realizado conforme procedimento descrito no item 3.3, testando-se os seguintes compostos orgânicos: querosene, óleo de motor (10W40), óleo de oliva, óleo mineral, óleo vegetal (soja), tolueno, hexano 60%, iso-octano, acetato de etila, butanol, clorofórmio, diclorometano e dicloroetano. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

3.7 Ensaios de crescimento e produção de biossurfactante realizados com o isolado selecionado

A seleção de um isolado para a continuidade dos estudos de crescimento e produção de biossurfactante teve como critérios o maior valor de E_{24} (%) atingido no teste de triagem inicial e o crescimento mais denso (em termos de densidade óptica) obtido em menor tempo de cultivo, comparados com os outros isolados.

Com o isolado selecionado inicialmente foram realizados cultivos para verificação simultânea da influência da salinidade e da agitação no crescimento e produção de biossurfactante. Segundo Makkar e Cameotra,⁷⁷ os processos de recuperação avançada de petróleo que utilizam microrganismos geralmente envolvem a exposição desses microrganismos a extremos de temperatura, pressão iônica, pH e salinidade, sendo necessário o uso de linhagens capazes de se desenvolverem em condições extremas. O parâmetro agitação foi escolhido pois em testes prévios com os isolados observou-se que a ausência da agitação nos cultivos promovia um maior índice de E_{24} . Posteriormente, foram realizados outros ensaios para o crescimento e produção de biossurfactante pelo isolado selecionado, utilizando-se um meio de cultura definido e variando-se as fontes de carbono (C) e nitrogênio (N) do meio, bem como a relação C/N.

3.7.1 Efeito da agitação e salinidade

Neste teste, o isolado selecionado foi cultivado em meio LB modificado, preparado com três concentrações salinas diferentes - 35, 70 e 140 g/L de NaCl - e incubados sem e com agitação. O acompanhamento dos cultivos foi feito durante oito dias, com medidas periódicas de densidade óptica e índice de emulsificação E_{24} .

Os cultivos foram preparados conforme descrito no item 3.5.3. Para cada salinidade testada – 35, 70 e 140 g/L de NaCl - foram preparados seis frascos de cultivo, sendo que três foram mantidos em agitação de 200 rpm e três, sem agitação. Um frasco contendo o meio de cultura estéril, sem inóculo, foi mantido nas mesmas condições dos cultivos, sendo utilizado como controle negativo para o crescimento e para o teste de produção de biossurfactante.

Alíquotas de 9 mL dos cultivos foram coletadas nos tempos 0, 2, 4 e 6 horas de incubação no 1º dia, e uma vez ao dia, do 2º ao 8º dia de experimento, para medidas de densidade óptica (DO), índice de emulsificação (E_{24}). As medidas de DO foram feitas em espectrofotômetro U2800 da marca Hitachi, no comprimento de onda de 600 nm. Os índices E_{24} foram medidos conforme descrito no item 3.3.

3.7.2 Efeito das fontes de Nitrogênio e Carbono e da relação C/N

Fatores como a fonte de carbono (C), a fonte de nitrogênio (N) e a relação carbono/nitrogênio (C/N) do meio podem afetar a quantidade, a qualidade e o tipo de biossurfactante produzido por bactérias.⁴⁰ Nesse sentido, foram planejados experimentos para determinar a melhor condição, considerando estes três fatores, para a produção de biossurfactante pelo isolado selecionado.

O meio escolhido para os cultivos foi o Meio Mineral (MM), descrito por Agarwal & Sharma⁷⁸ e utilizado pelos autores em testes de produção de biossurfactante por bactérias isoladas de reservatório de petróleo. A composição do meio é (g/L): Na_2HPO_4 (2,2), KH_2PO_4 (1,4), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,6), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01), NaCl (70), CaCl_2 (0,02), extrato de levedura (0,02). As fontes de nitrogênio e carbono foram adicionadas separadamente. O pH final do meio foi ajustado para $7,0 \pm (0,2)$. O meio foi preparado com água do mar sintética e suplementado com a solução de elementos traço (5 mL/L), já descritas no item 3.1. A salinidade do meio e a condição de agitação foram definidas a partir dos resultados obtidos nos testes descritos no item 3.7.1. Todos os cultivos foram feitos em triplicata, em frascos de vidro tipo Schott-Duran e incubados em estufa bacteriológica a 55 °C.

Os experimentos foram feitos em três etapas, alterando-se um dos fatores por vez. Inicialmente foi testada a relação C/N, utilizando-se glicose e nitrato de sódio como fontes de carbono (C) e nitrogênio (N), respectivamente, na presença e ausência de extrato de levedura. Estas fontes de C e N foram escolhidas por terem favorecido a produção de biossurfactante por alguns dos isolados em testes anteriormente realizados. A concentração do nitrato de sódio foi fixada em 1 g/L (m/v) e a concentração de glicose foi ajustada de modo a se obter as razões 2, 3, 5 e 7. O meio foi preparado com suas fontes de N e C em soluções separadas, esterilizadas em autoclave a 121 °C por 20 minutos, e adicionadas ao meio momentos antes do inóculo. Para a preparação dos pré-inóculos I e II, foram

seguidos os passos descritos no tópico 3.5.3. O inóculo foi adicionado na concentração final de 10% (v/v) e o crescimento microbiano foi acompanhado diariamente, durante 9 dias, por leitura de densidade ótica do meio, a 600 nm, e a produção de biossurfactante, pelo índice de emulsificação (E_{24}), conforme já descrito no item 3.3.

Na segunda etapa, três fontes de N foram testadas - NH_4Cl (cloreto de amônio), NaNO_3 (nitrato de sódio) e NH_4NO_3 (nitrato de amônio) - com e sem extrato de levedura. A concentração de cada fonte de N usada foi fixada em 1 g/L (m/v) e a concentração de glicose usada foi baseada no resultado da etapa 1, que determinou a relação de C/N mais adequada para a produção de biossurfactante.

Na terceira etapa foram testadas as seguintes fontes de C: glicerina, vaselina, glicose e sacarose. A melhor fonte de nitrogênio selecionada na etapa 2 foi fixada na concentração de 1 g/L (m/v) e as fontes de carbono a serem analisadas foram adicionadas na concentração ótima obtida na etapa 1. Para a medição da densidade ótica, cada amostra foi lavada duas vezes seguida de ressuspensão do *pellet* em tampão fosfato (cf. descrito no item 3.3).

Em cada uma das etapas, um frasco contendo o mesmo meio de cultura, estéril e sem inóculo, foi incubado juntamente com os frascos dos cultivos, servindo como controle.

3.8 Semi-purificação do biossurfactante produzido pelo isolado selecionado

O método da precipitação ácida, conforme descrito por Das e colaboradores,⁷⁹ permite a purificação parcial de um biossurfactante bacteriano a partir de um cultivo, processo que também nomeamos como semi-purificação.

Para tal processo, 1L de meio de cultura (Meio Mineral ou LB modificado) foi preparado em frasco de vidro tipo Schott-Duran com volume total de 2 litros, nas condições otimizadas resultantes dos testes descritos nos itens 3.7.1 e 3.7.2. Os pré-inóculos foram preparados em meio LB modificado, conforme descrito no item 3.5.3. Após 72 horas de crescimento em estufa a 55 °C, todo o volume do cultivo (1L) foi centrifugado a 4.500 rpm por 50 minutos para a separação das células. O sobrenadante foi colocado em um béquer de vidro ao qual uma solução concentrada de HCl foi adicionada até que seu pH atingisse 2, sendo este volume acondicionado em um frasco fechado de vidro do tipo Schott-Duran com volume total de 2 litros e

conservado a 4 °C por 12 horas. Após esse período, a amostra foi novamente centrifugada a 4.500 rpm por 80 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado obtido foi lavado duas vezes em água ultrapurificada em pH 2, ressuspenso em 10 mL de água ultrapurificada estéril e seu pH ajustado para $7,0 \pm (0,2)$, após o qual foi mantido em frasco de vidro tampado e sob refrigeração até seu uso. Para o cálculo de rendimento em massa, esta amostra foi liofilizada em SpeedVacTM por 12 horas, após o qual foi pesada.

3.9 Testes de estabilidade do biossurfactante semi-purificado

O biossurfactante semi-purificado foi testado quanto a sua estabilidade frente a diferentes condições de temperatura, pH e salinidade. Para a verificação da estabilidade térmica, alíquotas de 10 mL de uma solução 0,1% (p/v) do biossurfactante semi-purificado dispostas em frascos de vidro do tipo penicilina, com volume total de 30 mL, foram mantidas nas temperaturas -18° (em congelador); 4° (em refrigerador); 25°, 40°, 55°, 80° e 100 °C (em estufa bacteriológica), por 24 horas. As amostras também foram submetidas à esterilização por autoclave, por 20 minutos, 1 atm e 121°C.

Para o ensaio em diferentes condições de pH, um volume de 100 mL de uma solução 0,1% (p/v) do biossurfactante semi-purificado disposto em béquer de vidro teve seu pH ajustado para valores de 2, 4, 6, 7, 8, 10 e 12, utilizando-se soluções concentradas de HCl ou NaOH. A cada pH desejado, uma alíquota de 10 mL foi retirada do béquer e acondicionada em tubo do tipo falcon, de volume total de 50 mL, após o qual foi mantida em refrigeração (4 °C) até seu uso.

Para o ensaio do efeito da força iônica, amostras de 10 mL de uma solução 0,1% (p/v) do biossurfactante semi-purificado dispostas em tubos do tipo falcon, de volume total de 50 mL, tiveram sua salinidade ajustada para 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21% (p/v), a partir da adição de NaCl, e foram mantidas em refrigeração (4 °C) até seu uso.

Após cada condição ter sido atingida, as amostras foram avaliadas quanto à capacidade de emulsão, por meio do teste E_{24} (já descrito no item 3.3) e quanto à capacidade de redução da tensão superficial, aferida pelo teste do colapso da gota e por meio de medida direta em tensiômetro, explicados a seguir.

O teste do colapso da gota, descrito por Jain e colaboradores,⁸⁰ é usado para se medir a presença de compostos tensoativos que reduzem a tensão superficial de uma amostra. Nesse ensaio, usou-se uma tampa de microplaca ELISA de 96 poços (12,7 x 8,5 cm), previamente lavada com água quente, etanol puro e água destilada; esse processo foi repetido três vezes, e seca em seguida à temperatura ambiente. Dois microlitros (2 µL) de óleo lubrificante 10W40 (marca Raid[®]) foi adicionado em cada poço, seguida de estabilização à temperatura ambiente (25 °C) por 24 horas. Transcorrido este período, uma alíquota de 2,5 µL da amostra a ser testada foi adicionada sobre a fina camada de óleo contido no poço, com auxílio de um pipetador automático. O diâmetro da gota formada foi medido após se passar um minuto. O resultado foi considerado positivo para a presença de composto tensoativo quando a gota da amostra aumentou de diâmetro (“espalhou-se”), em comparação com o diâmetro da gota da solução controle. Alíquotas de água ultrapurificada, do meio de cultura fresco sem inóculo, de soluções salinas nas concentrações testadas e de soluções de água ultrapurificada ajustadas com os pHs testados foram utilizadas como controles negativos. As amostras foram testadas em sextuplicata.

A medição direta da tensão superficial das amostras foi determinada usando-se o tensiômetro automático (modelo Sigma 700, marca Attension), pelo método do anel de *Du Nouy*, descrito por Bodour e colaboradores.⁸¹ Este método envolve a elevação de um anel de platina até a superfície do líquido, sendo que a força (mN/m) necessária para que haja desprendimento entre o anel e a amostra está relacionada com a tensão superficial do líquido. Uma alíquota de 20 mL da solução de BS semi-purificado na concentração de 0,1% (p/v) foi dispensada em um béquer e este foi posicionado na base do tensiômetro. Após ser esterilizado em chama, um anel de platina foi submerso na amostra, sendo em seguida suspenso até a interface líquido-ar, até seu total desprendimento da amostra. Entre cada medição, o anel foi enxaguado com água, mergulhado em álcool 90% e esterilizado em chama. Como padrão foram feitas medições com água ultrapurificada, alíquotas do meio de cultura fresco, soluções salinas nas concentrações testadas e soluções de água ultrapurificada ajustadas com os pHs testados. As medidas diretas em tensiômetro foram feitas somente para três amostras de cada parâmetro testado (temperatura, pH e salinidade) que apresentaram as melhores respostas nos testes de E₂₄ e colapso de gota.

3.10 Avaliação da ação antimicrobiana do biossurfactante semi-purificado

O biossurfactante semi-purificado teve sua atividade antimicrobiana testada em alguns microrganismos-teste como *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), por meio dos testes de disco-difusão (ou método de Kirby-Bauer) e de diluição em caldo, conforme Das e colaboradores.⁷⁹ Estes autores utilizaram *B. subtilis* e *E. coli* em seus testes; duas outras linhagens Gram-positiva e Gram-negativa, respectivamente, *S. epidermidis* e *P. fluorescens*, foram por nós escolhidas para ampliar o espectro de bactérias testadas. Para o teste de disco-difusão, preparou-se um tubo de ensaio com 5 mL de Caldo Nutritivo, de composição (g/L): NaCl (5), peptona (5), extrato de levedura (2), extrato de carne (1) e pH $7,4 \pm (0,2)$,⁶⁹ que foi inoculado com uma alça-padrão de massa de crescimento de uma cultura-estoque do microrganismo-teste. O tubo foi incubado em temperatura ótima de crescimento ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para *B. subtilis*, *E. coli* e *S. epidermidis* e $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ para *P. fluorescens*) e agitação de 200 rpm até que atingisse a densidade óptica de 0,5 da escala de Mc Farland. Uma alíquota de 100 μL do cultivo foi espalhada, com o auxílio de uma alça de Drigalski, na superfície de uma placa com Ágar Mueller-Hinton (MH), de composição (g/L): ágar (17), hidrolisado ácido de caseína (17,5), extrato de carne (2), amido (1,5) com pH ajustado para $7,3 \pm (0,2)$.⁶⁹ Um (1) disco estéril de papel de filtro Whatman (no. 1), de 6 mm de diâmetro, embebido em solução-estoque estéril do biossurfactante (17mg/mL) foi colocado sobre um quadrante de uma placa com meio MH inoculada com um dos microrganismos-teste. A solução-estoque do biossurfactante também foi testada nas diluições de 10, 100 e 1000 vezes. Esse procedimento foi repetido para os quatro microrganismos-teste. As placas foram incubadas nas temperaturas ótimas de crescimento dos microrganismos-teste por 24 horas e o teste foi considerado positivo quando houve formação de um halo de inibição ao redor do disco de papel. Como controle positivo da sensibilidade dos microrganismos-teste a agentes antimicrobianos, o teste de disco-difusão foi repetido com diferentes antibióticos (ampicilina para *B. subtilis* e *E. coli*, vancomicina para *S. epidermidis* e canamicina para *P. fluorescens*) na concentração de 20 mg/mL e em soluções diluídas 10, 100 e 1.000 vezes.

Para o teste de diluição em caldo, três frascos de vidro do tipo Schott-Duran, de volume total de 100 mL, com 45 mL de meio MH foram inoculados com 5 mL cada de um pré-inóculo de um dos microrganismos-teste (preparado como descrito no início deste tópico). Em um dos frascos foi adicionada uma alíquota de 30µL de antibiótico na concentração de 20mg/mL (ampicilina para *B. subtilis* e *E. coli*, canamicina para *S. epidermidis* e vancomicina para *P. fluorescens*), enquanto que ao outro adicionou-se uma alíquota de 7 mL de solução-estoque de biossurfactante (17mg/mL). O terceiro frasco foi determinado como controle positivo do crescimento. Como controle da interação entre o biossurfactante e o meio de cultura, foram preparados dois frascos com meio MH, com e sem adição de biossurfactante, ambos sem inóculo. Os cinco frascos foram incubados por 24 horas, na temperatura ótima do microrganismo-teste. O monitoramento do crescimento foi feito por turbidimetria: alíquotas de 2 mL de cada frasco foram coletadas a cada hora, durante 8 horas, e na 24ª hora, para medição de densidade óptica a 625 nm.

As curvas obtidas foram comparadas por meio das taxas de crescimento (μ), calculadas pela equação 1. Para o cálculo, foram escolhidos os pontos de início (DO_i) e término (DO_t) da fase log de crescimento (quando observável). Este procedimento foi repetido para os quatro microrganismos-teste.

$$\mu = \frac{\ln DO_t - \ln DO_i}{t_t - t_i} ; [\mu] = h^{-1} \quad (1)$$

3.11 Análise estatística dos dados coletados

Todos os experimentos feitos para avaliar a produção de biossurfactante foram realizados em triplicata. Os resultados dos testes de avaliação da melhor salinidade, melhor fonte de carbono e melhor fonte de nitrogênio foram tratados por análise de variância (ANOVA), com um nível de significância de 5%, ou seja, diferenças estatísticas com p-Value < 0,05 foram consideradas significativas. À ANOVA seguiu-se o teste de comparação de médias de Tukey, aplicado para verificar quais tratamentos diferiam entre si, com o auxílio do software Minitab® 17.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento, triagem e caracterização dos isolados bacterianos produtores de biossurfactante

O isolamento de bactérias em meio sólido, a partir dos 12 frascos de cultivos-mãe recebido do CENPES-PETROBRAS não resultou em crescimento de colônias. Análises microscópicas destes cultivos mostraram a presença de células bacterianas em baixa densidade celular, e provavelmente com baixa taxa de viabilidade, o que pode explicar a ausência de crescimento em meio sólido. Como alternativa, novos cultivos líquidos em meio LB modificado foram feitos, utilizando como inóculos alíquotas dos cultivos-mãe. De quase todos estes cultivos foi possível isolar colônias bacterianas crescidas em meio LB modificado sólido (tabela 2). Para a seleção das colônias nas placas levou-se em consideração suas características morfológicas como tamanho, forma, elevação, borda, estrutura, brilho e cor. De modo geral, não houve diversidade de colônias quanto a estes aspectos, sempre predominando um só tipo em cada placa (figura 11). Neste caso, pelo menos duas colônias do tipo predominante foram nomeadas e armazenadas em culturas-estoque, para posterior triagem e caracterização.

Tabela 2 - Cultivos em meio LB modificado que resultaram no isolamento de colônias em meio sólido. + (houve crescimento de colônias), - (não houve crescimento de colônias).

Profundidade da rocha usada como inóculo	Salinidade do meio (g/L de NaCl)		
	35	70	120
A	+	-	-
B	+	-	-
C	+	+	+
D	+	-	+

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 11 -Colônias crescidas em meio sólido LB modificado, a partir dos cultivos líquidos em mesmo meio, inoculados com alíquotas dos cultivos-mãe. (a) Profundidade A, 35 g/L NaCl (b) Profundidade B, 35 g/L NaCl (c) Profundidade C, 35 g/L NaCl (d) Profundidade D, 35 g/L NaCl (e) Profundidade D, 70 g/L NaCl (f) Profundidade D, 120 g/L NaCl.

Fonte: Elaborada pela autora.

Um total de 38 isolados foram selecionados e submetidos ao teste de emulsificação (E_{24}) após sete (7) dias de crescimento a 55 °C em meio LB modificado, ajustado com a salinidade de origem. Para os isolados que apresentaram resultado negativo ou inferior a 10%, o teste foi repetido usando-se o extrato celular lisado, sendo todos resultados apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Resultados do teste de emulsificação E_{24} apresentados pelos 38 isolados selecionados a partir dos cultivos líquidos que tiveram como inóculo alíquotas do repique dos cultivos-mãe.

Nomenclatura	Profundidade (m)	Salinidade do meio de cultura (g/L de NaCl)	E_{24} (%)	
			Sobrenadante	Lisado celular
Ar35A1	A	35	---	---
Ar35A2	A	35	---	---
Ar35B1	B	35	---	---
Ar35B2	B	35	---	---
Ar35B3	B	35	11,6 ± 1,2	---
Ar35C1	C	35	4,7 ± 0,9	---
Ar35C2	C	35	---	---
Ar35C3	C	35	4,7 ± 1,1	---
Ar35C4	C	35	4,7 ± 1,0	---
Ar35C5	C	35	34,2 ± 2,1	---
Ar70C1	C	70	46,3 ± 3,9	---
Ar70C2	C	70	42,8 ± 3,5	---
Ar70C3	C	70	---	2,4 ± 1,0
Ar70C4	C	70	---	---
Ar70C5-1	C	70	38,5 ± 3,6	---
Ar70C5-2	C	70	57,8 ± 9,3	---
Ar70C6-1	C	70	59,3 ± 1,6	---
Ar70C6-2	C	70	60,4 ± 0,0	---
Ar70C7-1	C	70	60,5 ± 3,3	---
Ar70C7-2	C	70	65,1 ± 3,2	---
Ar70C8-1	C	70	58,8 ± 1,0	---
Ar70C8-2	C	70	60,0 ± 0,6	---
Ar70C9-1	C	70	62,4 ± 0,6	---
Ar70C9-2	C	70	63,1 ± 2,9	---
Ar70C10-1	C	70	63,9 ± 4,9	---
Ar70C10-2	C	70	59,3 ± 1,6	---
Ar120C1	C	120	---	---
Ar120C2	C	120	---	---
Ar120C3	C	120	---	---
Ar120C4	C	120	---	---
Ar35D1	D	35	---	---
Ar35D2	D	35	---	---
Ar35D3	D	35	---	---
Ar35D4	D	35	---	---
Ar35D5	D	35	---	---
Ar35D6	D	35	---	---
Ar120D1	D	120	---	---
Ar120D2	D	120	---	---

Os valores do teste de emulsificação nulos foram indicados por traços (---)

Fonte: Elaborada pela autora.

Os isolados obtidos da primeira e quarta profundidades (A e D) não apresentaram camada de emulsificação no teste de triagem. Embora o isolado Ar35B3 tenha apresentado um valor baixo de E_{24} , ele foi selecionado para sequenciamento pois foi o único isolado da segunda profundidade (B) que exibiu valor positivo para o índice de emulsificação. Quase todos os isolados obtidos de terceira profundidade (C) demonstraram resultados positivos no teste de E_{24} (extrato sobrenadante); a maioria pertencia aos cultivos com salinidade de 70 g/L, sugerindo tratarem-se de um mesmo microrganismo, fator confirmado após a identificação do gene do RNAr 16S.

Os isolados que apresentaram valores acima de 10% no índice de emulsificação (E_{24}) foram selecionados para a identificação pelo sequenciamento do gene do RNAr 16S, sendo o resultado apresentado na tabela 4.

Tabela 4 - Resultado da análise do sequenciamento do gene RNAr 16S para os isolados selecionados após a triagem para produção de biossurfactantes, que apresentaram resultados com valores acima de 10% no teste de E_{24} .

////	Microrganismo	Identidade (%)	NCBI - Sequência de referência
Ar35B3	<i>Melghirimyces thermohalophilus</i> (Nari11A)	90	NR_109725.1
Ar35C5	<i>Melghirimyces thermohalophilus</i> (Nari11A)	90	NR_109725.1
Ar70C1	<i>Bacillus alveayuensis</i> (TM1)	99	NR_043013.1
Ar70C2	<i>Pseudomonas libanensis</i> (CIP 105460)	96	NR_024901.1
Ar70C5	<i>Bacillus alveayuensis</i> (TM1)	99	NR_043013.1
Ar70C6-2	<i>Bacillus alveayuensis</i> (TM1)	99	NR_043013.1
Ar70C7-1	<i>Bacillus alveayuensis</i> (TM1)	99	NR_043013.1
Ar70C7-2	<i>Bacillus alveayuensis</i> (TM1)	99	NR_043013.1
Ar70C8-1	<i>Bacillus alveayuensis</i> (TM1)	99	NR_043013.1
Ar70C8-2	<i>Bacillus alveayuensis</i> (TM1)	99	NR_043013.1
Ar70C9-1	<i>Bacillus alveayuensis</i> (TM1)	99	NR_043013.1
Ar70C9-2	<i>Bacillus alveayuensis</i> (TM1)	99	NR_043013.1
Ar70C10-2	<i>Bacillus alveayuensis</i> (TM1)	99	NR_043013.1

Fonte: Elaborada pela autora.

Dos treze isolados submetidos à identificação pela técnica de amplificação do RNAr 16S, nove isolados apresentaram identidade de 99% com *Bacillus alveayuensis* (TM1), um isolado com 96% de identidade com *Pseudomonas*

libanensis e dois isolados com 90% de identidade com *Melghirimyces thermohalophilus*. Para a confirmação no nível taxonômico de espécie são necessários testes morfológicos, genotípicos e bioquímicos, ainda não realizados para os referidos isolados. Um índice de identidade a partir de 95% permite apenas confirmar o gênero de um microrganismo, caso de *Bacillus* e *Pseudomonas*. Entretanto, para efeito de análise e discussão dos dados obtidos trataremos os referidos isolados como pertencentes prováveis a estas espécies.

Estas três espécies indicadas são descritas como aeróbias e foram isoladas pela primeira vez a partir de ambientes marinhos (*Bacillus alveayuensis* e *Melghirimyces thermohalophilus*) e água de nascente (*Pseudomonas libanensis*), conforme descrição das espécies apresentada mais adiante. Magot e colaboradores,⁵ em revisão feita sobre microrganismos presentes em reservatórios de petróleo, sugeriram que apenas as bactérias anaeróbicas estritas poderiam ser consideradas verdadeiramente autóctones (nativas) em razão das características fisiológicas de muitos dos isolados deste ambiente e da ausência de oxigênio dissolvido nos reservatórios (exceto quando este é introduzido no reservatório a partir da injeção de fluidos). Bactérias exógenas podem ser introduzidas em reservatórios por meio dos fluidos utilizados na perfuração de um poço ou por meio da injeção de água no reservatório como técnica de aumento de produção de óleo (*water flooding*). A água utilizada nestes processos pode ter origem variada (água do mar, água de formação, água de rio).⁸ No caso do reservatório do qual foi extraída a rocha utilizada no presente trabalho, água marinha foi utilizada no processo de perfuração do poço, porém as informações obtidas a respeito do procedimento de obtenção das amostras de rocha (cf descrição no item 3.1) sugerem que a chance de contaminação das mesmas pelo fluido de perfuração foi mínima.

A seguir, apresenta-se a descrição das três espécies referidas, a partir dos artigos de proposição das mesmas. Bae e colaboradores⁸² descreveram duas linhagens da espécie *Bacillus alveayuensis*, TM1 e TM5, isoladas de sedimentos marítimos de mais de 4.000 metros de profundidade da região do Oceano Pacífico Ocidental. São bactérias termofílicas, Gram-positivas, aeróbicas, possuindo formato de bastonete e formadoras de endósporos. Apresentam crescimento em temperaturas entre 40 e 65 °C (não apresentando crescimento abaixo de 40 °C ou acima de 65 °C), pH entre 6,5 e 9, na presença de 0 - 4% de NaCl, tendo

crescimento ótimo a 55 °C, pH 7 e 3% de NaCl. Suas colônias são circulares, convexas, opacas e de coloração creme.

Melghirimyces thermohalophilus foi descrita por Addou e colaboradores,⁸³ que a isolaram do sedimento de um lago salgado (Chott Melghir) na Argélia. Este termoactinomiceto aeróbico é uma espécie de bactéria filamentosa, Gram-positiva, crescendo em concentrações de NaCl que variam de 5 a 20%, em temperatura de 43 a 60 °C, com pH entre 5 e 10. Suas colônias possuem coloração marrom apresentando micélio aéreo castanho claro.

Dabboussi e colaboradores⁸⁴ descreveram *Pseudomonas libanensis*, isolada de água de nascente no Líbano. Suas células possuem formato de bastonete, móveis, contendo um único flagelo polar; são aeróbicas e Gram-negativas, produzindo um pigmento fluorescente em meios específicos. Seu crescimento ocorre entre 4 e 36 °C com ótimo em 30 °C na presença de 3% de NaCl, sendo inibido acima de 7%. Suas colônias, em ágar nutritivo, são lisas, circulares e não pigmentadas; não apresentam importância clínica conhecida.

B. alveayuensis e *M. thermohalophilus*, nas respectivas descrições, apresentaram crescimento em alta temperatura e em salinidade moderada a alta. Entretanto, não é possível inferir a origem destas duas espécies ou de *P. libanensis* nas amostras de rocha do reservatório estudado, nem mesmo afirmar que as espécies pudessem apresentar atividade biológica neste ambiente.

Com relação à produção de biossurfactante por estas espécies, para *M. thermohalophilus* não há registro na literatura de produção deste composto, nem mesmo por outros gêneros da família Thermoactinomycetaceae, à qual pertence esta espécie. Para esta família há registros de gêneros que produzem substâncias com propriedades anti-tumorais.⁸⁵⁻⁸⁶

Quanto ao gênero *Bacillus*, Satpute e colaboradores⁸⁷ o descrevem como o mais estudado com relação à produção de biossurfactantes, que em sua maioria são lipopeptídeos. Arima e colaboradores⁸⁸ foram pioneiros nas pesquisas com o gênero *Bacillus*, sendo os primeiros a reportarem a produção de surfactina. Esse biossurfactante é um lipopeptídeo cíclico extremamente efetivo, reduzindo a tensão superficial eficientemente de 72 para 27 mN/m,⁸⁹ e também apresenta baixos valores de CMC, mostrando potencial aplicação em MEOR.

Saini e colaboradores⁹⁰ purificaram o biossurfactante viscosina produzido por um isolado que possuía 99% de similaridade com *P. libanensis*. Esse tensoativo

apresentou CMC de 54 mg/L e tensão superficial de 28 mN/m. A viscosina purificada formou emulsões estáveis em concentrações baixas (7,5 mg/L) e também inibiu a migração de células metastáticas de câncer de próstata sem aparente citotoxicidade, sugerindo possível aplicação ambiental e biomédica.

Tendo em vista que o isolado Ar70C7-2 apresentou o maior valor médio de índice de emulsificação $E_{24} = 65,1(\pm 3,2)\%$ - dentre os isolados testados, e que também apresentou um maior crescimento (em termos de densidade óptica) em menor tempo em comparação com os outros isolados de mesmo gênero, optou-se por selecioná-lo para os ensaios de caracterização, crescimento e produção de biossurfactante. Os outros isolados similares às outras duas espécies reportadas – *M. thermohalophilus* e *Pseudomonas libanensis* - serão avaliados em estudos futuros quanto a estes aspectos.

4.2 Caracterização morfológica e bioquímica do isolado selecionado

O isolado Ar70C7-2 exibiu morfotipo predominante em forma de bastonete, podendo apresentar-se como células isoladas, em pares ou filamentos (figura 12). Exibe colônias convexas de coloração creme, possuindo bordas lisas e circulares em meio sólido LB modificado (figura 13).

Figura 12 - Fotomicrografia de contraste de fase do isolado Ar70C7-2 com 1 dia de cultivo em meio LB modificado. Aumento de 1000x.

Fonte: Elaborada pela autora.

(a)

(b)

Figura 13 - Colônias crescidas em meio LB modificado após 7 dias de incubação a 55°C. (a) Imagem da placa de semeadura, aberta em fluxo laminar. (b) Observação das colônias por microscopia de campo claro (100x).

Fonte: Elaborada pela autora.

O teste de coloração diferencial de Gram demonstrou que o isolado Ar70C7-2 é uma bactéria Gram-positiva, conforme imagens obtidas por microscopia de campo claro (figura 14). As linhagens *B. subtilis* ATCC 6633 e *E. coli* ATCC 25922 foram usadas como padrão de comparação e são apresentadas na figura 15.

Figura 14 -Fotomicrografia obtida por microscopia de campo claro do isolado Ar70C7-2, corado pela Técnica de Coloração Diferencial de Gram (1000x).

Fonte: Elaborada pela autora.

(a)

(b)

Figura 15 - Fotomicrografias obtidas por microscopia de campo claro de *B. subtilis* ATCC 6633 (a) e *E. coli* ATCC 25922 (b), submetidos à Técnica de Coloração Diferencial de Gram (1000x).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.1 Teste de sensibilidade a antibióticos com o isolado Ar70C7-2

Os mecanismos de ação dos quatro antibióticos testados são descritos a seguir, baseado em Murray e colaboradores.⁹¹ É importante ressaltar que na literatura não há dados de sensibilidade a antibióticos registrados para *Bacillus*

alveayuensis, espécie similar ao isolado Ar70C7-2. Assim, foi necessária a escolha de antibióticos que apresentassem diferentes formas de ação e espectro.

Ampicilina: uma das primeiras penicilinas sintéticas de amplo espectro usada, ainda que sua ação contra bacilos Gram-negativos seja limitada a *Escherichia*, *Proteus* e *Haemophilus*. A atividade antibacteriana se dá através de seu anel beta-lactâmico que confere afinidade pelas enzimas transpeptidases e carboxipeptidases, as quais são responsáveis pelas ligações de peptideoglicanos. Atua inibindo a formação adequada da parede bacteriana, que, por sua vez, ocasiona a lise da bactéria em meios de menor osmolaridade (fluidos orgânicos).

Canamicina: é um aminoglicosídeo constituído por aminoaçúcares, ligados por pontes glicosídicas a um anel aminociclitol, isolado originalmente de espécies de *Streptomyces*. Possui atividade principalmente contra bacilos Gram-negativos, como por exemplo *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*. É um bactericida pois possui a capacidade de se ligar irreversivelmente à subunidade 30S do ribossomo, inibindo a síntese protéica.

Cloranfenicol: foi obtido inicialmente de *Streptomyces venezuelae*, atuando em amplo espectro, porém não é mais usado em muitos países, pois, além de interferir na síntese protéica das bactérias, ele pode interromper a síntese protéica de células da medula óssea humana. Possui efeito bacteriostático ligando-se de forma reversível ao componente peptidiltransferase da subunidade 50S do ribossomo, bloqueando, assim, a extensão do peptídeo. A resistência a esse antibiótico está relacionada à enzima cloranfenicol acetiltransferase, codificada em plasmídeos e que catalisam a acetilação do grupo 3-hidroxi do cloranfenicol.

Vancomicina: é um glicopeptídeo complexo produzido originalmente por *Streptomyces orientalis*. Sua atividade bactericida é decorrente da interrupção da síntese do peptideoglicano da parede celular em bactérias Gram-positivas. Muito usado em tratamentos de infecções causadas por bactérias resistentes aos antibióticos β -lactâmicos e a *Staphylococcus* resistentes à oxacilina. Não possui atividade contra bactérias Gram-negativas pois, devido ao tamanho de sua molécula, esse antibiótico não é capaz de atravessar os poros da membrana externa e alcançar seu sítio-alvo, o peptídeooglicano.

A figura 16 exhibe os resultados obtidos a partir do teste de sensibilidade do isolado Ar70C7-2 aos quatro antibióticos citados, por meio do método de microdiluição em caldo. Pode-se notar que o isolado apresentou maior sensibilidade

ao antibiótico ampicilina, pois é necessária uma menor concentração do mesmo para que ocorra a inibição de crescimento em comparação com os outros três antibióticos. Verificou-se também que a sensibilidade ao cloranfenicol e à vancomicina é similar, ambos inibindo o crescimento do isolado a partir da concentração de 10 µg/mL. A sensibilidade à canamicina só foi observada na concentração de 500 µg/mL, o que pode ser explicado pelo fato deste agente antimicrobiano possuir maior atividade em bactérias Gram-negativas.

Deve ser ressaltado que, no gráfico da figura 16, estão apresentadas as médias obtidas das densidades ópticas registradas; entretanto, por conta da escala adotada no gráfico, não é possível a visualização dos desvios-padrão em cada média. Para todos os valores de densidade óptica próximos a 0, os desvios permaneceram abaixo de 0,0001; já para os valores acima de 1, ficaram entre 0,001 e 0,003. Deve-se destacar também que o valor médio da densidade óptica obtida para os controles positivos e negativos foram de 1,220(±0,003) e 0,0203(±0,0001), respectivamente. Não foram encontrados dados na literatura sobre a sensibilidade de *Bacillus alveayuensis* a antibióticos.

Figura 16 - Resultado do teste de sensibilidade do isolado Ar70C7-2 aos antibióticos Ampicilina, Canamicina, Cloranfenicol e Vancomicina, avaliado pelo teste de microdiluição em caldo. Cada ponto corresponde à média da leitura da densidade óptica de 2 poços. Comparação do crescimento em meio LB modificado em diferentes concentrações.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 Avaliação da capacidade emulsificante sobre diferentes substratos orgânicos

O biossurfactante presente na fase sobrenadante dos cultivos do isolado Ar70C7-2 em meio LB modificado foi testado quanto à sua capacidade emulsificante sobre diferentes substratos orgânicos, conforme resultados apresentados na figura 17. Os maiores índices de emulsificação E_{24} foram registrados para o dicloroetano, tolueno e querosene, com valores médios de $68,8(\pm 9,8)\%$, $68,5(\pm 2,3)\%$ e $63,7(\pm 1,6)\%$, respectivamente. Como controle da interferência do meio de cultura no resultado do teste, o meio LB modificado estéril também foi testado frente aos mesmos substratos orgânicos em substituição ao sobrenadante do cultivo (na figura 17 estes resultados são denominados de Controle). Observamos que para os substratos óleo de motor, azeite e óleo vegetal os controles apresentaram valores positivos para E_{24} .

Fonseca e colaboradores⁹² avaliaram a ação emulsificante do biossurfactante presente na fase sobre sobrenadante de cultivos produzido por uma linhagem de *Bacillus subtilis*, isolada de solo contaminado com petróleo, sobre vários substratos e verificaram que o mesmo não teve atividade estável em querosene, gasolina, óleo diesel, óleo de soja e óleo de milho. Dastgheib et al.⁷⁶ registraram valores de E_{24} próximos de 70% para querosene, tolueno e xileno, testados com o biossurfactante semi purificado produzido por *B. licheniformis* ACO1. Faria e colaboradores⁹³ purificaram o biossurfactante surfactina produzido pela linhagem *B. subtilis* LSFM-05, obtendo altos índices de emulsificação usando óleo cru, $67,6(\pm 1,0)\%$; querosene $59,1(\pm 0,4)\%$ e tetradecano $58,0(\pm 0,3)\%$ como fases hidrofóbicas. O lipopeptídeo produzido pelo halófilo *B. tequilensis* CH foi capaz de produzir altas camadas de emulsão no teste E_{24} , usando óleo de coco (84%) e querosene (70%) como substratos.⁹⁴ O querosene é muito utilizado na literatura como fase apolar no teste de emulsificação, facilitando a comparação entre os resultados registrados. Por essa razão e pelos bons resultados apresentados pelo isolado Ar70C7-2 no teste de E_{24} do com esse substrato, e também por se tratar de um composto recuperável, menos tóxico e mais acessível do que o tolueno e o dicloroetano, o querosene foi mantido como substrato para os testes de emulsificação.

Figura 17 - Índices médios de emulsificação E_{24} do biossurfactante produzido pelo isolado Ar70C7-2 em diferentes substratos orgânicos.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Ensaios de crescimento e produção de biossurfactante realizados com o isolado Ar70C7-2

Inicialmente foram realizados cultivos para verificação simultânea da influência da salinidade e da agitação no crescimento e produção de biossurfactante pelo isolado Ar70C7-2. A figura 18 apresenta os resultados registrados nestes ensaios, em termos de densidade óptica e índice de emulsificação E_{24} . Os cultivos controles (meios de cultura sem inóculos) não apresentaram formação de camada de emulsificação no teste E_{24} (dados não mostrados nos gráficos), demonstrando que todos os resultados positivos ao teste durante o estudo foram decorrentes da produção de biossurfactante pelo microrganismo em questão.

Figura 18 - Crescimento e produção de biossurfactante por Ar70C7-2 nas condições sem agitação e a 200 rpm e meio com (a) 35 g/L de NaCl (b) 70 g/L de NaCl (c) 140 g/L de NaCl

Fonte: Elaborada pela autora

No cultivo contendo 35 g/L de NaCl, mostrado na figura 18a, houve um crescimento abundante do isolado em ambas condições de agitação, com maior média de turbidez - $1,734(\pm 0,047)$ - medida em 192 horas na condição sem agitação. A produção de biossurfactante foi maior na condição sem agitação, em todos os períodos medidos, em comparação com os cultivos em agitação, apresentando o maior valor médio de E_{24} - $69,7(\pm 1,3)\%$ - no tempo 192 horas. A partir de 24 horas na condição estática, os valores de E_{24} mantiveram-se altos e estáveis, variando de $58,9(\pm 1,0)$ a $69,7(\pm 1,3)\%$.

Os cultivos em meio com 70 g/L de NaCl também apresentaram crescimento abundante em ambas as condições de agitação, sendo registrada a maior média de turbidez - $1,602(\pm 0,035)$ - nas 168 horas de cultivo sem agitação (figura 18b). O maior índice médio de E_{24} foi $70,1(\pm 2,9)\%$ no período de 192 horas, no cultivo sem agitação. Nesta condição, a partir de 72 horas de cultivo, o E_{24} médio permaneceu acima de 50%, variando entre $56,1(\pm 6,3)$ e $70,1(\pm 2,9)\%$. Na condição de 200 rpm, notamos que a partir de 24h os valores de E_{24} não demonstraram estabilidade, apresentando valores que oscilaram entre $23,6(\pm 15,1)$ e $47,3(\pm 9,0)\%$.

O crescimento do isolado Ar70C7-2 na salinidade de 140 g/L de NaCl exibiu média máxima de turbidez em 168 horas de cultivo com agitação, atingindo o valor de $1,702(\pm 0,055)$, como observado na figura 18c. Ao contrário das outras duas salinidades testadas, na condição estática a turbidez não ultrapassou o valor de 0,5. Na condição de agitação, os valores médios de E_{24} permaneceram abaixo de 50% em todo o período, excetuando o tempo de 72 horas, quando registrou-se maior índice médio de E_{24} , $53,7(\pm 3,9)\%$. Independente da condição de agitação, no período de 24 a 192 horas, observou-se uma oscilação nos índices E_{24} , que variaram de $26,8(\pm 6,0)$ a $53,7(\pm 3,9)\%$ para 200 rpm e de $32,4(\pm 5,9)$ a $42,9(\pm 6,9)\%$ sem agitação.

De modo geral, os cultivos mantidos em agitação de 200 rpm, nas condições de salinidade de 35 g/L (figura 18a) e 70 g/L (figura 18b), apresentaram oscilação nos índices E_{24} ao longo do experimento, ao contrário do observado nos cultivos sem agitação, nas mesmas salinidades, cujos índices evoluíram de modo crescente e regular. Uma hipótese que pode justificar esse evento seria a formação de espuma ocasionada pela agitação. A formação de espuma pode diminuir a eficiência de transferência de oxigênio e pode também remover células e biossurfactante do meio, diminuindo o rendimento do BS produzido por microrganismos aeróbios.⁹⁵⁻⁹⁷

Entretanto, essa hipótese não explica o ocorrido nos cultivos com salinidade de 140 g/L, que apresentaram oscilação nos índices E_{24} tanto na condição de agitação como na sem agitação (figura 18c). Nestes cultivos, a produção de biossurfactante foi menor na condição sem agitação, ao contrário do observado nos cultivos com 35 e 70 g/L de NaCl, cuja produção de BS foi maior quando sem agitação.

Estudo feito com uma linhagem halotermofílica de *Bacillus* isolada de fluidos de reservatório de petróleo por Dastgheib e colaboradores⁷⁶ mostrou que esta linhagem apresentou maior capacidade emulsificante em cultivos estáticos, quando comparados com cultivos em agitação de 150 rpm e em anaerobiose. A concentração de NaCl e a temperatura ótimas para a produção do agente emulsificante foi 4% (p/v) e 45 °C, respectivamente.

A diferença apresentada entre os cultivos mantidos em agitação e estáticos foi nítida. Todos os valores de E_{24} obtidos na condição de 200 rpm nas salinidades de 35 e 70 g/L ficaram abaixo dos índices medidos na condição estática, além de apresentarem grande oscilação na produção. Assim, consideramos que a melhor forma de incubação para esse isolado é a estática.

Para verificar o efeito do fator salinidade na produção de biossurfactante, propôs-se uma análise de variância (ANOVA), levando em conta somente os dados obtidos para a condição estática, pois essa comprovou ser a melhor condição de produção de biossurfactante. Também foi selecionado o período que apresentou maiores índices de E_{24} , ou seja, o tempo de 192h. Após a escolha do nível de significância 5% (0,05), uma tabela ANOVA foi construída (tabela 5) para verificar a influência do fator salinidade na produção de biossurfactante.

Tabela 5 - Tabela ANOVA para os valores do índice de emulsificação E_{24} (%) com os dados obtidos no tempo 192h dos cultivos nas três salinidades testadas.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F	p-Value
Salinidade	2	1450,9	725,47	37,40	0,000
Erro	6	116,4	19,40		
Total	8	1567,3			

Fonte: Elaborada pela autora.

Neste caso, observamos que o p-Value para a salinidade é menor que o nível de significância 5% (0,05); portanto, há evidências de diferenças significativas entre os tratamentos, ou seja, a produção de biossurfactante é influenciada pelo fator

salinidade. Com isso, aplicou-se o Teste de Tukey para comparar as médias de E_{24} , no tempo 192h, nas três salinidades testadas, cujo resultado é mostrado na figura 19.

Figura 19 - Resultados do Teste de Tukey para a análise da influência da salinidade na produção de biossurfactante do isolado Ar70C7

Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 19 nos mostra que o índice de emulsificação na salinidade de 140 g/L é estatisticamente diferente do que o índice obtido nas salinidades de 35 e 70 g/L. Temos que os valores de E_{24} alcançados na maior salinidade sempre permaneceram abaixo dos valores obtidos nas menores salinidades, com isso, e com o resultado apresentado no gráfico mostrado na figura 19, podemos afirmar que a concentração de 140 g/L de NaCl não é considerada a melhor salinidade para a produção de biossurfactante.

Observamos que a produção de biossurfactante nas salinidades de 35 e 70 g/L deram-se de forma similar na condição estática, sendo constatado na figura 19 que não há diferença significativa entre os valores de E_{24} no período de 192h de incubação. Assim, como a análise estatística não forneceu uma salinidade de ótima produção, procedemos à construção de um *boxplot*, representado na figura 20, que dispõe os valores médios de E_{24} bem como a diferença entre o valor máximo e

mínimo para cada dado obtido, permitindo uma rápida identificação e comparação destes valores. Dessa maneira, quanto menor a coluna mostrada no gráfico, menor é a variação entre os dados e, portanto, menor o desvio padrão de cada medida.

Analisando-se o gráfico da figura 20, nota-se que no cultivo estático, com salinidade de 70 g/L, houve uma maior produção e menor variação entre os valores de E_{24} nos pontos finais da curva, em comparação com os valores registrados para o cultivo estático com salinidade de 35 g/L. Dessa forma, a salinidade de 70 g/L na condição estática foi escolhida para os testes posteriores de condições de cultivo para a produção de biossurfactante.

Figura 20 - Boxplot da evolução da produção de biossurfactante pelo isolado Ar70C7-2
Fonte: Elaborada pela autora.

4.5 Efeito das fontes de Nitrogênio e Carbono e da relação C/N

Uma vez definidas as condições ótimas de salinidade e agitação dos cultivos - 70 g/L de NaCl e sem agitação-, optou-se por investigar três parâmetros importantes na produção de biossurfactante: fonte de carbono (C), fonte de nitrogênio (N) e a razão entre elas. O Meio Mineral utilizado nestes ensaios contém extrato de levedura (EL) em sua composição original,⁷⁸ mas sabemos que esse composto altera a concentração e composição dos parâmetros selecionados para o estudo.

Por esse motivo, optou-se pela realização dos testes na presença e na ausência de EL.

O primeiro parâmetro estudado foi a relação entre as fontes de carbono e nitrogênio. A partir de testes realizados anteriormente neste e em outro Meio Mineral⁶⁹ (dados não mostrados), foi observado que o isolado Ar70C7-2 apresentou valores altos para o índice de emulsificação em relações C/N próximas a 2, indicando que não seria necessário testar-se altas taxas de C/N. Desse modo, optou-se por testar os valores de 2, 3, 5 e 7 para a razão C/N. As fontes de carbono e nitrogênio usadas para esse teste foram glicose e NaNO₃, respectivamente. Essas fontes foram escolhidas pois o isolado demonstrou bom crescimento e boa produção de biossurfactante em meios testados previamente que contiveram estas fontes. Os resultados obtidos de densidade óptica e índice de emulsificação E₂₄ para todas as relações de C/N testadas estão apresentados na figura 21.

Observou-se uma maior produção de BS na menor relação C/N testada, ou seja, 2. Como pode ser observado na figura 21, somente os cultivos realizados com esta razão C/N apresentaram valores de E₂₄ acima de 60%, sendo 66,7(±4,1)% o maior índice médio de E₂₄ observado no meio com EL em 192h de cultivo e 64,5(±1,3)%, no meio sem EL. A condição C/N = 2 também foi a única que apresentou valores de densidade óptica acima de 0,5, onde os valores máximos foram observados em 216h: 1,136(±0,018) com EL e 1,005(±0,062) sem EL. A partir do exposto, não se achou necessária a realização da análise estatística para a verificação de desempenho entre as relações C/N testadas, pois a relação C/N = 2 foi a única que apresentou valores de E₂₄ acima de 50%, sendo, por isso, a relação escolhida para os testes subsequentes. Uma baixa relação C/N mostra que o microrganismo utiliza uma menor quantidade de substrato para a produção de biossurfactante, sendo, portanto mais economicamente viável.⁹⁸

A razão C/N do meio interfere na produção de biossurfactante e o valor ótimo varia entre as linhagens bacterianas. Fonseca e colaboradores,⁹² ao otimizar a taxa de C/N para a linhagem *B. subtilis* YRE207 isolada de solo contaminado de refinaria de petróleo, obtiveram a melhor razão C/N igual a 3 (dentre as razões 3, 9 e 13) como aquela cujo sobrenadante livre de células apresentava maior redução na tensão superficial, indicando maior produção de compostos tensoativos. Já Reis e colaboradores⁴⁵ não observaram diferenças de produção de biossurfactante (expressa em termos de CMC⁻¹) no intervalo da razão C/N de 6,4 a 25,6, em estudo

feito com *B. subtilis* ATCC 6633. Saikia e colaboradores,⁹⁸ para a linhagem *Pseudomonas aeruginosa* RS29, verificaram um aumento na produção de ramnolipídeo (medida por meio da tensão superficial) proporcional ao aumento na razão C/N, sendo a razão ótima igual a 12,5, dentre as testadas (2,5; 7,5; 12,5; 22,5).

Figura 21 - Resultados do teste do efeito da relação C/N sobre o desempenho do crescimento (medido pela densidade óptica) e da produção de biosurfactante (medido pelo teste E₂₄) pelo isolado Ar70C7-2.

Fonte: Elaborada pela autora.

Diferentes fontes de carbono e de nitrogênio e íons metálicos têm sido empregados em estudos que visam a otimização da produção de biossurfactantes por microrganismos, particularmente por linhagens de *Bacillus*.^{45,77,99-102} No caso do nitrogênio, o tipo de composto nitrogenado utilizado e a sua concentração no meio de cultura são fatores importantes na regulação da produção de biossurfactante e diversos autores relatam que a sua limitação promove um aumento na síntese destas moléculas tensoativas.³³

Para o estudo da influência da fonte de nitrogênio na produção de biossurfactante pelo isolado Ar70C7-2 foram testados três compostos - Nitrato de Sódio (NaNO_3), Cloreto de Amônio (NH_4Cl), Nitrato de Amônio (NH_4NO_3) - e a associação das três fontes, todos na presença e ausência de extrato de levedura. A fonte de carbono usada nesse teste foi a glicose e a relação C/N adotada foi igual a 2.

A figura 22 apresenta os resultados obtidos nos testes das fontes de nitrogênio. Analisando os gráficos, observa-se que em todos os cultivos houve a produção de BS atingindo altos valores após 48h, tanto na condição sem extrato de levedura (variando de 53,6% a 70,4%) quanto na com extrato de levedura (variando de 53,6% a 70,5%). Temos que o meio contendo NH_4Cl suplementado com extrato de levedura atingiu um valor alto para turbidez ($1,151 \pm 0,082$) em menor tempo (72 horas) com E_{24} de $70,2(\pm 2,3)\%$, segundo maior valor obtido para a fonte de nitrogênio NH_4Cl . Porém, o maior valor obtido de densidade óptica foi de $1,380(\pm 0,050)$ com NH_4NO_3 após 240h de cultivo e na ausência de extrato de levedura, com E_{24} de $66,9(\pm 3,2)\%$, o maior valor para o índice de emulsificação obtido para a fonte de nitrogênio NH_4NO_3 .

Os valores máximos de E_{24} atingidos para cada fonte com EL e sem EL foram: NaNO_3 , $67,7(\pm 0,9)\%$ (com EL) e $67,9(\pm 0,9)\%$ (sem EL); NH_4Cl , $70,5(\pm 2,5)\%$ (com EL) e $68,1(\pm 1,7)\%$ (sem EL); NH_4NO_3 , $67,7(\pm 2,0)\%$ (com EL) e $66,9(\pm 3,2)\%$ (sem EL) e com as três fontes, $69,4(\pm 2,3)\%$ (com EL) e $70,4(\pm 4,7)\%$ (sem EL).

Figura 22 - Resultados do teste do efeito da fonte de N sobre o desempenho do crescimento (medido pela densidade óptica) e da produção de biossurfactante (medido pelo teste E₂₄) pelo isolado Ar70C7-2.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como todos os valores de índice de emulsificação foram todos muito próximos, foi necessária uma análise estatística para verificar a igualdade ou não entre eles. O tempo de 72h foi selecionado para essa análise pois a partir deste período os valores de E_{24} tenderam a estabilizar. Após a escolha do nível de significância 5% (0,05), pode-se construir uma tabela ANOVA (tabela 6) para verificar a influência dos fatores Fonte de N, Extrato de Levedura e a interação entre eles.

Tabela 6 - Tabela ANOVA feita com os valores do índice de emulsificação E_{24} (%) registrados no tempo 72h, em todas as condições testadas.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F	p-Value
Extrato de levedura	1	0,83	0,829	0,03	0,870
Fonte de N	3	503,36	167,788	5,61	0,008
Extrato levedura*Fonte N	3	138,55	46,183	1,54	0,242
Erro	16	478,93	29,933		
Total	23	1121,67			

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir da tabela 6 observamos que o p-Value para a interação dos fatores extrato de levedura e fonte de N é maior que o nível de significância 5% ($0,242 > 0,05$), e, portanto, não há evidências de que haja interação entre os dois fatores. Como não há interação entre eles, é necessário se analisar os efeitos principais de cada um individualmente. Assim, observando o p-Value, tanto da presença de extrato de levedura, quanto da fonte de N, notamos que somente o p-Value para a fonte de N é menor do que o nível de significância; portanto, estatisticamente, somente esse fator influencia a produção de biossurfactante. Para compararmos o desempenho da produção de BS nas quatro condições de fontes de nitrogênio testadas, aplicamos o teste de Tukey, cujos resultados são apresentados na figura 23.

Figura 23 - Resultados do Teste de Tukey para a análise da influência do tipo da fonte de Nitrogênio na produção de biossurfactante pelo isolado Ar70C7-2 com 72h de cultivo.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir do gráfico apresentado na figura 23, temos que o Nitrato de Sódio se diferencia de todas as outras fontes, enquanto os meios que continham Cloreto de Amônio, Nitrato de Amônio e a associação das três fontes, produziram valores para o índice de emulsificação que são estatisticamente iguais (barras próximas ao valor 0,0 do gráfico). Contudo, isso não indica que Nitrato de Sódio é a melhor fonte dentre as testadas, bastando observar o período de 72h, no gráfico descrito na figura 22, cujo valor médio de E_{24} para esta fonte foi menor, com e sem EL, se comparado às outras três condições.

Considerando que os valores de E_{24} para as fontes NH_4NO_3 e NH_4Cl são estatisticamente iguais, para estudos futuros um critério que poderia auxiliar na escolha de uma das fontes seria a quantidade, em massa, do biossurfactante produzido nos cultivos com estas duas fontes. Alguns estudos de otimização da produção de BS utilizam este parâmetro (massa de biossurfactante produzido), em conjunto com a redução na tensão superficial e/ou índice de emulsificação, para avaliar a melhor fonte de nitrogênio.^{77,99,102}

No entanto, para efeito do presente estudo, optou-se por escolher a fonte NH_4Cl na condição sem extrato de levedura para o próximo teste (o de variação da

fonte de C), a preferência por esta fonte de nitrogênio se deu pela sua disponibilidade. Davis e colaboradores⁹⁹ realizaram estudo para verificar a influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Os autores registraram que o meio contendo sulfato de amônio resultou em baixa produção de surfactina e o meio contendo nitrato de sódio apresentou um rendimento celular muito baixo (biomassa medida em g/L), sem ter sido avaliada a produção de surfactina por essa razão. A produção de surfactina foi maior com a utilização do nitrato de amônio como fonte de N. Os autores acompanharam o consumo dos íons nitrato e amônio ao longo dos cultivos e concluíram que a produção de surfactina chegava ao valor máximo quando o nitrato exauria-se do meio, sustentando a hipótese que na presença das duas fontes – amônio e nitrato – a primeira sustentava o crescimento celular inicial, e a produção de surfactina começava a aumentar quando o nitrato tornava-se o nutriente limitante, podendo esse fato ser um “sinal” para a produção de surfactina via metabolismo secundário. Estudo anterior de Potvin & Péringer¹⁰³ com o actinomiceto *Saccharopolyspora erythraea* havia estabelecido uma ligação entre a produção de metabolitos secundários com os níveis aumentados da enzima glutamina sintetase induzida por nitrato. Esta enzima medeia a síntese da glutamina, um composto precursor da eritromicina (antibiótico metabolito secundário produzido por esta espécie).

Nossos resultados não podem ser comparados de forma direta aos resultados de Davis e colaboradores,⁹⁹ cujos dados de produção de surfactina são expressos em massa. Em nosso estudo, a produção de BS foi avaliada pela atividade emulsificante e os resultados obtidos com as 3 fontes mostraram rendimento celular (medido pela DO) e atividade emulsificante próximas, com exceção do cultivo com nitrato de sódio, cujo rendimento celular foi mais baixo que nas outras duas fontes.

Por fim, o último parâmetro analisado foi a fonte de carbono (C). Os critérios para a seleção dos compostos foram o tamanho da cadeia de carbono e a solubilidade, a partir dos quais foram escolhidas as seguintes fontes: glicerina (C₃ - solúvel), glicose (C₆ - solúvel), sacarose (C₁₂ - solúvel) e vaselina U.S.P. (>C₂₅ - insolúvel). Cada fonte de C foi adicionada ao Meio Mineral preparado com as condições otimizadas nas etapas anteriores, ou seja, relação C/N 2, NH₄Cl como fonte de N e sem extrato de levedura. A figura 24 apresenta os dados de E₂₄ e densidade óptica (DO) obtidos a partir destes cultivos.

Pelos gráficos observamos que o crescimento nos cultivos com as fontes solúveis, avaliado pela DO, foi mais abundante que no cultivo com a fonte insolúvel, que pode ser explicado pelo fato desta não estar totalmente disponível para a utilização. O maior valor médio de E_{24} foi observado nos cultivos com glicerina, no terceiro dia, atingindo $69,1(\pm 2,4)\%$.

Uma análise estatística foi feita para comparar a ação emulsificante do biossurfactante produzido nos cultivos com as diferentes fontes de carbono, selecionando-se os valores de E_{24} obtidos após 72h de cultivo. O nível de significância de 5% (0,05) foi escolhido, sendo construída, com isso, a tabela ANOVA 7.

Figura 24 - Resultados do teste do efeito da fonte de C sobre o desempenho do crescimento (medido pela densidade óptica) e da produção de biossurfactante (medido pelo teste E₂₄) pelo isolado Ar70C7-2 após 72h de cultivo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 7 - Tabela ANOVA feita com os valores do índice de emulsificação E_{24} (%) registrados no tempo 72h nos cultivos com as diferentes fontes de C testadas.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F	p-Value
Fonte de C	3	1564,8	521,61	15,02	0,001
Erro	8	277,9	34,74		
Total	11	1842,7			

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir da tabela 7 observamos que o p-Value para a fonte de C é menor do que o nível de significância 5% ($0,001 > 0,05$), portanto, há evidências de que esse fator influencia na produção de biossurfactante. Para verificarmos quais fontes de C são significativamente diferentes entre si foi necessário aplicar o teste de Tukey, cujo resultado é apresentado na figura 25.

Figura 25 - Resultado do teste de Tukey para análise estatística da influência do tipo da fonte de Carbono na produção de biossurfactante pelo isolado Ar70C7-2 com 72h de cultivo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com base no gráfico apresentado na figura 25, temos que somente sacarose e a vaselina U.S.P. apresentaram valores de E_{24} que não são significativamente diferentes entre si. Como os cultivos com glicose e glicerina apresentaram os maiores valores de E_{24} dentre as quatro fontes testadas e sendo eles estatisticamente distintos, classificamos a glicerina como a melhor fonte para a

produção de biossurfactante, nas condições usadas, uma vez que com esta fonte obteve-se o maior valor médio de E_{24} no tempo 72h.

A fonte de carbono pode influenciar a síntese de biossurfactante por indução ou repressão. Em alguns casos a adição de substratos não miscíveis pode induzir a produção de BS.³³ Em nosso trabalho, a vaselina, uma fonte de C não miscível, não estimulou o crescimento celular, porém registrou-se a produção de BS, cujos índices E_{24} em diferentes momentos da curva alcançaram valores um pouco acima de 50%. Não é possível afirmar se o BS detectado no extrato analisado é resultado da liberação do BS aderido à célula ou à produção lenta pelo isolado Ar70C7-2. Duvnjak e Kosaric¹⁰⁴ observaram em *Corynebacterium lepus* crescida em meio com glicose a liberação de BS após a adição de hexadecano ao meio.

Glicose e glicerina têm sido utilizadas com fontes de carbono em estudo de produção de biossurfactante de espécies de *Bacillus*, ambas fornecendo bons resultados ou em termos de redução de tensão superficial e/ou relativo ao índice de emulsificação. No caso da glicerina, destacamos o trabalho de Sousa e colaboradores,⁴⁷ que registraram boas capacidades de redução de tensão superficial e de emulsificação por sete linhagens de *Bacillus* cultivadas em meio mineral contendo glicerina bruta, um sub-produto da produção de biodiesel a partir do óleo de soja.

Reis e colaboradores⁴⁵ avaliaram a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC 6633 a partir de meios com diferentes fontes de carbono, algumas delas resíduos industriais (glicose, açúcar comercial, suco de cana, melaço de cana, silo da fermentação alcoólica de cana, glicerol, manitol e óleo de soja). Todas as fontes testadas favoreceram a produção de BS (avaliada pela redução da tensão superficial) porém os autores não observaram correlação entre crescimento celular e produção de BS. Açúcar comercial e glicose promoveram a maior redução na tensão (55,5% e 53%, respectivamente); glicerol promoveu uma redução de 35%.

Dastgheib e colaboradores⁷⁶ ao estudarem a produção de bioemulsificante por uma linhagem halotermofílica de *B. liqueniformis* (ACO1) isolada de reservatório de petróleo iraniano verificaram que, dentre as fontes de carbono testadas, o maior índice E_{24} foi obtido com o uso de extrato de levedura, seguido de sacarose, glicose e frutose (os índices variaram de cerca de 70% a 60%); glicerina também foi testada porém este índice registrado foi baixo (cerca de 15%).

Pereira e colaboradores¹⁰⁵ avaliaram três linhagens de *B. subtilis*, isoladas de óleo oriundo de reservatório de petróleo brasileiro, quanto à produção de biossurfactantes em diferentes condições nutricionais e registraram que o uso da sacarose em meio mineral, dentre várias fontes de carbono solúveis e não solúveis testadas, proporcionou a maior produção de biossurfactante (em massa) bem como as maiores reduções de tensão superficial (a partir do extrato de cultivo livre de células). Uma das linhagens (#573) exibiu maior índice de emulsificação quando cultivada em meio com glicerina, ao contrário das outras duas linhagens (#309 e #311) cujos maiores índices de emulsificação foram registrados em cultivos com fontes complexas (extrato de levedura e extrato de carne, respectivamente).

Por fim, foi realizada uma comparação entre as melhores condições de cultivo obtidas para a produção de biossurfactante pelo isolado Ar70C7-2 e de microrganismos do gênero *Bacillus* descritos na literatura isolados de reservatório de petróleo ou de ambientes contaminados com óleo e/ou derivados de petróleo (tabela 8).

Tabela 8 - Comparação das condições ótimas de cultivo entre o isolado Ar70C7-2 e diferentes microrganismos do gênero *Bacillus* descritos na literatura.

Condições de cultivo ótimas para a produção de BS	Microrganismo						
	Ar70C7-2	<i>B. licheniformis</i> ⁷⁶	<i>B. circulans</i> ⁷⁹	<i>B. subtilis</i> ⁹²	<i>B. methylotrophicus</i> ¹⁰⁶	<i>Bacillus</i> sp. ¹⁰⁷	<i>B. licheniformis</i> ¹²⁰
Fonte de Carbono	Glicerina	Extrato de Levedura	Glicose	Sacarose	Óleo Cru	Glicose	Glicose e sacarose
Fonte de Nitrogênio	NH ₄ Cl	NaNO ₃	NH ₄ NO ₃	NH ₄ NO ₃	NaNO ₃	NH ₄ NO ₃	NaNO ₃
Relação C/N	2	5	3	3	NI	2	20
Tempo de cultivo (h)	72	168	26	48	192	96	NI
Temperatura (°C)	55	45	37	30	35	37 (37 - 60)*	(35 - 45)**
Salinidade (g/L)	70 (35 - 140)*	40	0,01	NI	30	10 (10 - 120)*	50
E24 máximo (%)	70	65	NI	NI	78	66	NI
Tensão superficial (mN/m)	43,3	NI	28,0	35,7	28,0	26,8	28,3

NI: Não informado. * Intervalo testado. ** Informado somente o intervalo ótimo.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.6 Teste de estabilidade do biossurfactante semi-purificado

O biossurfactante semi-purificado (BS-SP), produzido a partir dos cultivos do isolado Ar70C7-2 nos meios LB modificado e Meio Mineral otimizado, teve sua capacidade tensoativa testada frente às variações de pH, temperatura e salinidade. Cada 1L de cultivo em meio LB modificado e em Meio Mineral otimizado produziram 0,24g e 0,17g de biossurfactante semi-purificado, respectivamente.

A figura 26 apresenta fotos do precipitado formado após a etapa de precipitação ácida (26a) e do extrato bruto seco obtido (26b), obtidos no processo de semi-purificação do biossurfactante.

Figura 26 - Fotos de etapas do processo de semi-purificação do biossurfactante obtido a partir do cultivo do isolado AR70C7-2. (a) Frasco com o precipitado formado após 12 horas da adição do HCl concentrado ao sobrenadante do cultivo em Meio Mineral otimizado. (b) Extrato bruto seco obtido a partir da liofilização do precipitado formado em (a).

Fonte: Elaborada pela autora.

Observamos que os extremos de temperatura não afetaram a capacidade de emulsificação do BS-SP obtido do cultivo em meio LB modificado, cujos valores médios de E_{24} variaram de $62,2(\pm 2,1)\%$ a $69,8(\pm 1,6)\%$; para o controle (BS-SP que não sofreu variação de temperatura) registrou-se $64,0(\pm 3,5)\%$ e para a água ultrapurificada e o meio estéril LB modificado, sem inóculo, os valores de E_{24} foram insignificantes (nulos) (figura 27a). Quanto ao diâmetro da gota observamos um aumento da mesma em todas as condições de temperatura as quais as amostras foram submetidas, se comparadas com a água ultrapurificada ($2,27 \pm 0,06\text{mm}$). O

menor e o maior aumento do diâmetro da gota foram de 0,36 e 0,54 mm, nas temperaturas de 55 e 121 °C (autoclave), respectivamente. Os valores de tensão superficial do BS-SP obtidos para as amostras testadas estão indicados na figura 27a, sendo o valor para água ultrapurificada igual a 72,80 mN/m. As reduções nas tensões variaram de 35,8% a 40,5%.

Para o BS-SP obtido do cultivo em Meio Mineral observamos que a variação dos índices de emulsificação frente às diferentes temperaturas foi mínima, oscilando entre 62,9(±1,8)% e 64,8(±1,7)% (figura 27b). Novamente, foi observado um aumento no diâmetro da gota, com maior variação observada na amostra submetida a 121 °C (autoclave), de 0,61 mm, e menor variação na amostra mantida a 4 °C, 0,49 mm. As reduções nas tensões variaram de 38,8% a 42,2%.

Figura 27 - Teste de estabilidade frente a diferentes temperaturas feito com o biossurfactante semi-purificado obtido a partir de (a) meio LB modificado e (b) Meio Mineral. No gráfico estão representadas as médias obtidas para o índice de emulsificação E_{24} (%), em barras; as médias do diâmetro da gota, indicadas pelos pontos vermelhos; as médias da tensão superficial, indicadas pelos valores acima das barras.

Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 28a mostra as médias de E_{24} observadas para o BS-SP obtido de cultivo em meio LB modificado, cuja solução teve o pH ajustado em diferentes valores. Extremos de pH não afetaram sua capacidade emulsificante, cujos valores variaram entre 59,6($\pm 15,1$)%, em pH 10, e 70,4($\pm 1,2$)%, em pH 12. Observamos um aumento do diâmetro da gota em todos os pHs testados, se comparados com as medidas feitas com água ajustada ao mesmo pH. A maior diferença no diâmetro da gota medido foi de 0,44 mm e a menor, 0,23 mm, para pH 10 e pH 8, respectivamente. As reduções nos valores de tensão superficial observadas na solução do BS-SP ajustada aos pHs 2, 7 e 12, em comparação com as medidas feitas em água ajustada no pH correspondente estão indicados na figura 28a. As reduções nas tensões variaram de 36,4% a 39,1%.

Do mesmo modo, o BS-SP produzido a partir do cultivo em Meio Mineral não teve sua capacidade emulsificante muito reduzida, com valores de E_{24} variando entre 56,5($\pm 1,4$)%, em pH 12, e 64,8($\pm 1,7$)%, em pH 7 (figura 28b). Também observamos um aumento do diâmetro da gota em todos os pHs testados, porém este aumento foi maior que o observado para o BS-SP obtido do meio LB modificado: o maior aumento foi registrado no pH 10, de 0,60 mm, e o menor aumento foi registrado no pH 12, de 0,48 mm. As reduções nas tensões variaram de 35,2% a 42,2%.

Figura 28 - Teste de estabilidade frente a diferentes pHs feito com o biossurfactante semi-purificado obtido a partir de (a) meio LB modificado e (b) Meio Mineral. No gráfico estão representadas as médias obtidas para o índice de emulsificação E_{24} (%), em barras; as médias do diâmetro da gota, indicadas pelos pontos vermelhos; as médias do diâmetro da gota da solução-controle (água nos pHs avaliados), indicadas pelos pontos pretos; as médias da tensão superficial, indicadas pelos valores acima das barras.

Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 29 mostra o resultado obtido para o teste de estabilidade em diferentes concentrações de NaCl para os BS-SP obtidos dos cultivos feitos em meio LB modificado (figura 29a) e Meio Mineral (figura 29b). Assim como nos outros parâmetros, os valores de E_{24} não sofreram alterações significativas ($p\text{-Value} > 0,05$), com valores compreendidos entre $61,5(\pm 3,7)$ e $70,3(\pm 3,8)\%$ para o BS-SP do meio LB modificado, e entre $62,5(\pm 1,6)$ e $67,6(\pm 1,6)\%$ para o BS-SP do Meio Mineral. Para o teste de colapso da gota, os maiores aumentos do diâmetro de gota observados ocorreram com o BS-SP do meio LB modificado, cujo maior aumento – 1,0 mm - ocorreu na salinidade de 21% e o menor aumento, 0,44 mm, em 3%. Para o BS-SP do Meio Mineral, o maior aumento observado – 0,51 mm - também ocorreu na salinidade de 21% e menor aumento em 15%, com 0,39 mm. As tensões superficiais medidas estão indicadas nas figuras 29a e 29b para LB modificado e Meio Mineral, respectivamente. As reduções nas tensões variaram de 36,1% a 42%, para o meio LB modificado, e de 39% a 41,1%, para o Meio Mineral.

(a)

(b)

Figura 29 - Teste de estabilidade frente a diferentes concentrações de NaCl feito com o biossurfactante semi-purificado obtido a partir de (a) meio LB modificado e (b) Meio Mineral. No gráfico estão representadas as médias obtidas para o índice de emulsificação E_{24} (%), em barras; as médias do diâmetro da gota, indicadas pelos pontos vermelhos; as médias do diâmetro da gota da solução-controle, indicadas pelos pontos pretos; as médias da tensão superficial, indicadas pelos valores acima das barras.

Fonte: Elaborada pela autora.

Chandankere e colaboradores¹⁰⁶ realizaram estudo com uma linhagem de *Bacillus methyilotrophicus* isolada de reservatório de petróleo e verificaram o efeito do pH, temperatura e salinidade na atividade emulsificante do BS presente no estrato livre de células de cultivos desta bactéria. Os índices E_{24} registrados foram menores em pHs ácidos, tendo o maior valor sido observado em pH 8 (78%). O maior valor de E_{24} , também de 78%, foi registrado na salinidade de 6%, dentre as testadas (2 a 12%), e os autores associaram este resultado ao seu comportamento de halofílico moderado na natureza. Os índices E_{24} mantiveram-se igual ou acima de 60% nas diferentes temperaturas testadas, sendo a de 35 °C a que forneceu o maior valor (78%).

Zhou e colaboradores¹⁰⁷ analisaram a estabilidade de um lipopeptídeo produzido por uma linhagem de *Bacillus* isolada de solo contaminado na China. Os pesquisadores relataram que o biossurfactante, produzido após 32h de cultivo, foi capaz de reduzir a tensão superficial da água deionizada para 24,6 mN/m, mantendo suas características após ser analisado em diferentes temperaturas (-70 °C a 121 °C), salinidades (0 - 10% de NaCl) e pH (5 - 12), onde todos os índices de emulsificação permaneceram acima de 50%. Observaram também que em pH mais baixos houve uma redução na capacidade emulsificante, se comparada com pH alcalino, fator que não foi observado no BS-SP do isolado Ar70C7-2. Os referidos autores também observaram uma precipitação parcial do BS em valores baixos de pH (menores do que 4), fato também observado em nossa pesquisa e também reportado em Vilela e colaboradores¹⁰⁹ e Coronel-León e colaboradores,¹¹⁰ que estudaram lipopeptídeos produzidos por *Brevibacterium luteolum* e *Bacillus licheniformis*, respectivamente. Essa precipitação poderia ser causada pela falta de repulsão eletrostática entre moléculas vizinhas existente no valor de pH igual ao ponto isoelétrico, condição que ocasiona coalescência e agregação, fazendo com que haja formação de precipitado.¹¹¹

Os microrganismos marinhos *Brevibacterium aureum* MSA13,¹¹² produtor do lipopeptídeo nomeado como brevifactina, e *Nocardiopsis lucentensis* MSA04,¹¹³ produtor de glicolipídeo, foram isolados de esponjas marinhas (*Dendrilla nigra*) coletadas em profundidades rasas (10 a 15 metros) na costa da Índia. Ambos tensoativos tiveram sua produção aumentada na razão C/N de 0,5, apresentando grande capacidade tensoativa e alta estabilidade em variações de pH, salinidade e

temperatura. Ambos tensoativos mostraram alto potencial para aplicação nos processos de recuperação melhorada de petróleo.

Amani e colaboradores¹¹⁴ consideram MEOR como uma técnica de recuperação terciária que pode recuperar o óleo residual usando microrganismos ou os biossurfactantes produzidos por eles. Entretanto, a aplicação desses tensoativos na recuperação melhorada depende da manutenção de suas propriedades em condições ambientais extremas. Por isso, os testes de estabilidade foram realizados abordando as situações encontradas normalmente nos reservatórios de petróleo, tais como altas temperaturas e salinidades, bem como extremos de pH. Os resultados mostraram que o biossurfactante produzido pelo isolado Ar70C7-2 foi capaz de manter sua alta capacidade emulsificante nas condições testadas. Haba e colaboradores¹¹⁵ consideram como bons produtores de biossurfactante aqueles microrganismos que são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 40 mN/m, valor de tensão próximo do obtido pelo BS-SP do nosso isolado.

Assim, o BS-SP produzido pelo isolado Ar70C7-2, tanto a partir de cultivos em meio LB modificado como de Meio Mineral, demonstrou que sua capacidade emulsificante e de redução de tensão superficial foram pouco afetadas pelas condições extremas testadas, o que sugere uma potencial aplicação nos processos de MEOR.

4.7 Avaliação da ação antimicrobiana do biossurfactante semi-purificado

A figura 30 apresenta os resultados do teste de disco-difusão realizado para avaliar a ação bactericida/bacteriostática do biossurfactante semi-purificado (BS-SP) frente a quatro bactérias-teste. Pode-se notar que não houve formação de halo de inibição ao redor dos discos embebidos com o BS-SP na concentração de 17 mg/mL e nas diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000, concluindo que o mesmo não apresenta ação antimicrobiana frente às bactérias testadas. Os resultados do teste de disco-difusão feito como controle positivo da sensibilidade das bactérias-teste a antibióticos (ampicilina, canamicina e vancomicina) são apresentados na figura 31, confirmando a sensibilidade das mesmas a pelo menos dois dos antibióticos testados.

Figura 30 - Resultados do teste de disco-difusão para avaliação da ação antimicrobiana do biossurfactante semi-purificado em diferentes concentrações, frente às bactérias-teste. (a) *Escherichia coli* (ATCC 25922); (b) *Bacillus subtilis* (ATCC 6633); (c) *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) e (d) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228).

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 31 - Resultados do teste de disco-difusão para confirmação da sensibilidade das bactérias-teste frente aos antibióticos ampicilina, canamicina e vancomicina, em diferentes concentrações. (a) *Escherichia coli* (ATCC 25922) com discos contendo ampicilina; (b) *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) com discos contendo ampicilina; (c) *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) com discos contendo canamicina e (d) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) com discos contendo vancomicina.

Fonte: Elaborada pela autora.

O BS-SP também foi avaliado quanto à sua possível ação antimicrobiana por meio do teste de macrodiluição em caldo, cujos resultados são apresentados graficamente na figura 32. Neste teste observamos que o BS-SP, na concentração de 17 mg/mL, não foi capaz de inibir o crescimento das mesmas bactérias-teste, que apresentaram crescimentos semelhantes aos crescimentos apresentados nos respectivos controles. Apesar do BS-SP não ter apresentando ação antimicrobiana sobre as bactérias nos dois testes realizados, esse resultado não pode ser considerado conclusivo, uma vez que, estando na sua forma semi-purificada, sua

concentração real pode não ter atingido a concentração mínima para inibir as bactérias testadas.

Além das possíveis aplicações em recuperação de petróleo, recentemente os biossurfactantes vêm se destacando por possuírem diversas propriedades de importância terapêuticas e biomédicas, apresentando propriedades antibacteriana, antifúngica e antiviral.¹¹⁶⁻¹¹⁸ Também se destacam por possuírem ação antiadesiva, impedindo a formação de biofilme por diversos microrganismos patogênicos.^{56,119}

Das e colaboradores⁷⁹ descrevem os lipopeptídeos como a classe mais amplamente estudada e divulgada de biossurfactantes com ação antimicrobiana. Os pesquisadores caracterizaram um biossurfactante do tipo lipopeptídeo produzido pelo microrganismo marinho *Bacillus circulans* que apresentava pronunciada ação antimicrobiana contra um grupo de patógenos Gram-positivos e Gram-negativos, incluindo alguns microrganismos multi-resistentes como *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA).

Outros lipopeptídeos antimicrobianos incluem: a surfactina (liquenissina e pumilacidina), produzida pelo gênero *Bacillus* que possui ação anticoagulante, atividade antiviral, antitumoral, atividade antibacteriana, antifúngica e inibidora de enzimas;^{56,108-120} a iturina, também produzida por *B. subtilis*, um potente agente antifúngico também usado como biopesticida;¹²¹⁻¹²² a fengicina, potente sobre fungos filamentosos, produzido por *B. subtilis*.¹²³

O gênero *Bacillus* é descrito como um produtor de biossurfactante do tipo lipopeptídeo e sabendo que o isolado Ar70C7-2 pertence a esse gênero, muito provavelmente o tensoativo estudado neste trabalho pertença a essa classe de biossurfactantes. Desse modo, testes futuros com o BS deste isolado deverão considerar uma possível ação antimicrobiana também sobre outras classes de microrganismos e células.

Figura 32 - Resultados do teste de macrodiluição em caldo para avaliação da ação antimicrobiana do biossurfactante semi-purificado em diferentes concentrações, frente às bactérias-teste. (a) *Bacillus subtilis* (ATCC 6633); (b) *Escherichia coli* (ATCC 25922); (c) *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) e (d) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228).

Fonte: Elaborada pela autora.

5 CONCLUSÕES

- Os cultivos iniciais usando amostras rochosas de reservatório de petróleo como inóculo feitos com o intuito de promover o isolamento de bactérias produtoras de biossurfactantes foi bem sucedido. Um total de 38 isolados foi obtido, dos quais 16 apresentaram valores índice de emulsificação (E_{24}) que variaram entre 11 e 65%. O sequenciamento do gene rRNA 16S foi realizado para 13 destes isolados, dos quais 10 apresentaram similaridade de 99% com *Bacillus alveayuensis*. Destas, a linhagem Ar70C7-2 foi selecionada para os estudos de produção de BS.
- O isolado Ar70C7-2 produziu um biossurfactante com uma boa capacidade emulsificante sobre diversos substratos orgânicos, particularmente de derivados de petróleo, sugerindo uma potencial aplicação em processos de MEOR.
- A produção de biossurfactante foi maior e mais estável na condição sem agitação em meio LB.
- Nos cultivos em Meio Mineral com glicose e nitrato de sódio como fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente, e na relação C/N igual a 2, observou-se uma maior produção de BS.
- Nos cultivos em Meio Mineral tendo glicose como fonte de carbono, a produção de biossurfactante não foi influenciada pela ausência de extrato de levedura.
- Nos cultivos em Meio Mineral, tendo cloreto de amônio como fonte de nitrogênio e relação C/N 2, a maior produção de biossurfactante foi registrada com o uso de glicerina como fonte de carbono, apresentando maior valor médio de E_{24} de 69,1% após 72h.
- O isolado Ar70C7-2 produziu um BS com boas propriedades emulsificante e redutora de tensão superficial em condições termofílicas e halofílicas. As condições de cultivo que proporcionaram os melhores índices de emulsificação e de redução de tensão superficial foram: Meio Mineral definido com glicerina e cloreto de amônio como fontes de C e N, respectivamente, salinidade de 70g/L NaCl, temperatura de 55°C, sem agitação.

- O biossurfactante semi-purificado obtido do isolado Ar70C7-2 apresentou estabilidade na sua ação tensoativa num amplo intervalo de temperatura (-18 a 121°C), de salinidade (0 a 21% de NaCl) e de pH (2 - 12), podendo-se associar estas características ao ambiente de origem do isolado (com altas temperaturas e salinidade).
- O biossurfactante semi-purificado não apresentou atividade antimicrobiana na faixa de concentração e contras as linhagens bacterianas testadas. Embora os resultados iniciais tenham sido negativos, é importante que esse teste seja repetido com o biossurfactante purificado, além de uma avaliação da ação antifúngica e antiviral do mesmo.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos no presente trabalho abrem perspectivas para os seguintes estudos:

- a) testes de produção de biossurfactante a partir de substratos de baixo custo, com vistas à redução de custos nos processos de recuperação de petróleo (MEOR) *in situ*.
- b) otimização estatística dos componentes do meio de cultura utilizado (Meio Mineral) para a produção de biossurfactante, por meio da metodologia de superfície de resposta, que poderá indicar uma condição que promova um aumento no rendimento do BS produzido pela linhagem Ar70C7-2;
- c) melhoramento das técnicas de extração e purificação do BS bem como estudos para a sua caracterização química, que também poderão auxiliar na escolha das condições de cultivo para um aumento do seu rendimento;
- d) testes de transporte do BS em meio poroso encharcado com óleo para avaliar sua ação na remoção do óleo do meio poroso sob fluxo de água.

REFERÊNCIAS

- 1 MILANI, E.J.; BRANDÃO, J.A.S.L.; ZALÁN, P.V.; GAMBOA, L.A.P. Petróleo na margem continental brasileira: geologia, exploração, resultados e perspectivas. **Brazilian Journal of Geophysics**, v. 18, n. 3, p. 352-396, 2000.
- 2 TASSINARI, C.C.G. Cenário atual de petróleo e gás natural perspectivas de exploração de reservas não convencionais no Brasil. Disponível em <<http://www.campetro.org.br/PDF/4usp.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2016.
- 3 PLANCKAERT, M. Oil reservoirs and oil production. In: OLLIVIER, B.; MAGOT, M. (Ed.). **Petroleum microbiology**. Washington: ASM Press, 2005. p. 3-19.
- 4 PETROLEUM Geoscience Technology. **Geologia do Petróleo**. Disponível em: <http://albertowj.files.wordpress.com/2010/03/geologia_do_petroleo.pdf>. Acesso em: 08 mar. 2016.
- 5 MAGOT, M.; OLLIVIER, B.; PATEL, B.K. Microbiology of petroleum reservoirs. **Antoine van Leeuwehoek**, v. 77, n. 2, p. 103-116, 2000.
- 6 RAINEY, F.A.; OREN, A. Extremophile microorganisms and the methods to handle them. In: RAINEY, F.A.; OREN, A. (Ed.). **Extremophiles, methods in microbiology**. Amsterdam: Elsevier, 2006. p. 1-25. (Methods in microbiology, v.35).
- 7 PHILIPPI, G.T. On the depth, time, and mechanism of origin of the heavy to medium gravity naphtenic crude oil. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 41, n. 1, p. 33-52, 1977.
- 8 MAGOT, M. Indigenous microbial communities in oil fields. In: OLLIVIER, B.; MAGOT, M. (Ed.). **Petroleum microbiology**. Washington: ASM Press, 2005. p. 21-33.
- 9 YOUSSEF, N.; ELSHAHED, M.S.; McINERNEY, M.J. Microbial processes in oil fields: culprits, problems, and opportunities. **Advances in Applied Microbiology**, v.66, p. 141-251, 2009. doi: 10.1016/S0065-2164(08)00806-X.
- 10 MUYZER, G.; STAMS, A.J.M. The ecology and biotechnology of sulfate reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 441-454, 2008. doi: 10.1038/nrmicro1892.
- 11 JEANTHON, C.; NERCESSIAN, O.; CORRE, E.; GRABOESKI-LUX, A. Hyperthermophilic and methanogenic archaea in oil fields. In: OLLIVIER, B.; MAGOT, M. (Ed.). **Petroleum microbiology**. Washington: ASM Press, 2005. p. 55-70.
- 12 OLLIVIER, B.; CAYOL, J.L. Fermentative, iron-reducing, and nitrate-reducing microorganisms. In: OLLIVIER, B.; MAGOT, M. (Ed.). **Petroleum microbiology**. Washington: ASM Press, 2005. p. 71-88.

- 13 RÖLING, W.F.M.; HEAD, I.M.; LARTER, S.R. The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. **Research in Microbiology**, v.154, n. 5, p. 321-328, 2003.
- 14 AITKEN, C.M.; JONES, D.M.; LARTER, S.R. Anaerobic hydrocarbon biodegradation in deep subsurface oil reservoirs. **Nature**, v.431, p. 291-291, 2004. doi: 10.1038/nature02922.
- 15 VOORDOUW, G.; ARMSTRONG, S.M.; REIMER, M.F.; FOUT, B.; TELANG, A.J.; SHEN, Y.; GEVERTZ, D. Characterization of 16S rRNA genes from oil field microbial communities indicates the presence of a variety of sulfate-reducing, fermentative, and sulfide-oxidizing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1623-1629, 1996.
- 16 TELANG, A.J.; EBERTSFOGHT, J.M.; WESTLAKE, D.W.S.; JENNEMAN, G.E.; GEVERTZ, D.; VOORDOUW, G. Effect of nitrate injection on the microbial community in an oil field as monitored by reverse sample genome probing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1785–1793, 1997.
- 17 ROZANOVA, E.P.; BORZENKOV, I.A.; TARASOV, A.L.; SUNTSOVA, L.A.; DONG, C.H.L.; BELYAEV, S.S.; IVANOV, M.V. Microbiological processes in a high-temperature oil field. **Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 102-110, 2001.
- 18 VASCONCELLOS, S.P.; ANGOLINI, C.F.F.; GARCÍA, I.N.S.; DELLAGNEZZE, B.M.; SILVA, C.C.; MARSAIOLI, A.J.; SANTOS NETO, E.V.; OLIVEIRA, V.M. Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs. **Organic Geochemistry**, v. 41, n. 7, p. 675–681, 2010.
- 19 CRUZ, G.F.; VASCONCELLOS, S.P.; ANGOLINI, C.F.; DELLAGNEZZE, B.M.; GARCIA, I.N.; OLIVEIRA, V.M.; SANTOS NETO, E.V., MARSAIOLI, A.J. Could petroleum biodegradation be a joint achievement of aerobic and anaerobic microorganisms in deep sea reservoirs? **AMB Express**, v. 1, p. 47, 2011. doi: 10.1186/2191-0855-1-47.
- 20 VON DER WEID, I.; KORENBLUM, E.; JURELEVICIUS, D.; ROSADO, A.S.; DINO, R.; SEBASTIÁN, G.V.; SELDIN, L. Molecular diversity of bacterial communities from subseafloor rock samples in a deep-water production basin in Brazil. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 5-14, 2008.
- 21 KORENBLUM, E.; VALONI, É.; PENNA, M.; SELDIN, L. Bacterial diversity in water injection systems of Brazilian offshore oil platforms. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 85, n. 3, p. 791-800, 2010.
- 22 GIEG, L.M.; JACK, T.R.; FOGHT, J. M. Biological souring and mitigation in oil reservoirs. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.92, n. 2, p. 263-282, 2011.
- 23 REN, H-Y.; ZHANG, X-J.; SONG, Z-Y., RUPERT, W.; GAO, G-J.; GUO, S-X.; ZHAO, L-P. Comparison of microbial community compositions of injection and

production well samples in a long-term water-flooded petroleum reservoir. **PLoS ONE**, v.6, n. 8, e23258, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0023258.

24 NAZINA, T.N.; PAVLOVA, N.K.; TATARKIN, Y. V.; SHESTAKOVA, N.M.; BABICH, T.L. ; SOKOLOVA, D.S. H.; IVOILOV, V.S. ; KHISAMETDINOV, M.R.; IBATULLIN, R.R.; TOUROVA, T.P.; BELYAEV, S.S.; IVANOV, M.V. Microorganisms of the carbonate petroleum reservoir 302 of the romashkinskoe oilfield and their biotechnological potential. **Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 190-200, 2013.

25 PIUBELI, F.; GROSSMAN, M.J.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; DURRANT, L.R. Phylogenetic analysis of the microbial community in hypersaline petroleum produced water from the Campos Basin. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21,n. 20, p. 12006-12016, 2014.

26 GAO, P.; TIAN, H.; LI, G.; SUN, H.; MA, T. Microbial diversity and abundance in the xinjiang luliang long-term water-flooding petroleum reservoir. **Microbiology Open**, v. 4, n. 2, p. 332-342, 2015.

27 LESLIE, T.; XIAO, H.; DONG, M. Tailor-modified starch/cyclodextrin-based polymers for use in tertiary oil recovery. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 46, n. 4, p. 225-232, 2005.

28 BROWN, L. R. Microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p. 316-320, 2010. doi: 10.1016/j.mib.2010.01.011.

29 BACHMANN, R.T.; JOHNSON, A.C.; EDYVEAN, R.G.J. Biotechnology in the petroleum industry: an overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 86, p. 225-237, 2014. doi:10.1016/j.ibiod.2013.09.011.

30 LAZAR, I.; PETRISOR, I.G.; YEN, T.F. Microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Petroleum Science and Technology**, v. 25, p. 1353-1366, 2007. doi: 10.1080/10916460701287714.

31 BANAT, I.M.; MAKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495-508, 2000.

32 MUKHERJEE, A.K.; DAS, K. Microbial surfactants and their potential applications: an overview. In: SEN, R. (Ed.). **Biosurfactants**. New York: Springer, 2010. p. 54-64. (Advances in experimental medicine and biology, v. 672).

33 CAMEOTRA, S.S.; MAKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 50, n. 5, p. 520-529, 1998.

34 DALTIN, D. **Tensoativos**: química, propriedades e aplicações. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2012.

35 NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

- 36 SILVA, C.C.; VASCONCELLOS, S.P.; DELLAGNEZE, B.M.; GARCÍA, I.N.S.; OLIVEIRA, V.M. Potencial de bibliotecas metagenômicas de ambientes associados a petróleo para aplicação em biorremediação. **Microbiologia in Foco**, n.16, p. 39-46, 2011.
- 37 RON, E.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v.3, n. 4, p. 229-236, 2001.
- 38 DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.
- 39 DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SIVAPATHASEKARAN. C.; SEN, R. Microbial surfactants of marine origin: potentials and prospects. In: SEN, R. (Ed.). **Biosurfactants**. New York: Springer, 2010. p. 88-101. (Advances in experimental medicine and biology, v. 672).
- 40 KHIRE, J.M. Bacterial biosurfactants, and their role in microbial enhanced oil recovery (MEOR). In: SEN, R.(Ed.). **Biosurfactants**. New York: Springer, 2010. p. 146-157. (Advances in experimental medicine and biology, v. 672).
- 41 SANTA ANNA, L.M.; SEBASTIAN, G.V.; MENEZES, E.P.; ALVES, T.L.M.; SANTOS, A.S.; PEREIRA JUNIOR, N.; FREIRE, D.M.G. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA I isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.19, n. 2, p. 159-166, 2002.
- 42 WEI, Y.H; WANG, L.F.; CHANG, J.S. Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 3, p. 979-983, 2004.
- 43 WEI, Y.H.; CHU, I.M. Mn^{2+} improves production of surfactin by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 6, p. 479-482, 2002.
- 44 FOX, S.L.; BALA, G.A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, v.75, n. 3, p. 235-240, 2000.
- 45 REIS, F.A.S.L.; SÉRVULO, E.F.C.; FRANÇA, F.P. Lipopeptide surfactant production by *Bacillus subtilis* grown on low-cost raw materials. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 115, n. 1, p. 899-912, 2004.
- 46 NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 336-341, 2006.
- 47 SOUSA, M; MELO, V.M.M.; RODRIGUES, S.; SANT'ANA, H.B.; GONÇALVES, L.R.B. Screening of biosurfactant-producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 6, p. 897-906, 2012.

- 48 BENINCASA, M.; MARQUÉS, A. M.; PINAZO, A.; MANRESA, A. Rhamnolipid surfactants: alternative substrates, new strategies. In: SEN, R.(Ed.). **Biosurfactants**. New York: Springer, 2010. p. 170-184. (Advances in experimental medicine and biology, v. 672).
- 49 RANDHAWA, K.K.S.; RAHMAN, P.K.S.M. Rhamnolipid biosurfactants-past, present, and future scenario of global market. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014. doi: 10.3389/fmicb.2014.00454.
- 50 JINFENG, L.; LIJUN, M.; BOZHONG, M.; RULIN, L.; FANGTIAN, N.; JIAXI, Z. The field pilot of microbial enhanced oil recovery in a high temperature petroleum reservoir. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 48, n. 3-4, p. 265–271, 2005.
- 51 YOUSSEF, N.; SIMPSON, D.R.; MCINERNEY, M.J.; DUNCAN, K.E. In-situ lipopeptide biosurfactant production by *Bacillus* strains correlates with improved oil recovery in two oil wells approaching their economic limit of production. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 127-132, 2013. doi:10.1016/j.ibiod.2012.05.010.
- 52 ROSENBERG, E.; RON, E.Z. High- and low-molecular-mass antimicrobial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 154-162, 1999.
- 53 STANGHELLINI, M.E.; KIM, D.H.; RAMUSSEN, S.L.; RORABAUGH, P.A. Control of root rot of peppers caused by *Phytophthora capsici* with non-ionic surfactant. **Plant Disease Journal**, v. 80, n. 10, p. 1113-1116, 1996.
- 54 ROMERO, D.; DE VICENTE, A.; OLMOS, J.L.; DÁVILA, J.C.; PÉREZ-GARCIA, A. Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 969-976, 2007.
- 55 HSIEH, F-C.; LIN, T-C.; MENG, M.; KAO, S-S. Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A. **Current Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 1-5, 2008.
- 56 RODRIGUES, L.R.; TEIXEIRA, J.A. Biomedical and therapeutic applications of biosurfactants. In: Sen R. (Ed.). **Biosurfactants**. New York: Springer, 2010. p. 75-87. (Advances in experimental medicine and biology, v. 672).
- 57 GUDIÑA, E.J.; RANGARAJAN, V.; SEN, R.; RODRIGUES, L.R. Potential therapeutic applications of biosurfactants. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 12, p. 667-675, 2013.
- 58 SEYDLOVÁ, G.; SVOBODOVÁ, J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. **Central European Journal of Medicine**, v. 3, n. 2, p. 123-133, 2008.
- 59 THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; BANAT, I.M. Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus*

megaterium using economically cheaper sources. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 917-925, 2008.

60 CHRISTOVA, N.; TUVELA, B.; NIKOLOVA-DAMYANOVA, B. Enhanced hydrocarbon biodegradation by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v. 59, n. 3-4, p. 205-208, 2004.

61 INÈS, M.; DHOUHA, G. Lipopeptide surfactants: production, recovery and pore forming capacity. **Peptides**, v. 71, p. 100–112, 2015. doi: 10.1016/j.peptides.2015.07.006.

62 NERURKAR, A.S. Structural and molecular characteristics of lichenysin and its relationship with surface activity. In: Sen, R. (Ed.). **Biosurfactants**. New York: Springer, 2010. p. 304-315. (Advances in experimental medicine and biology, v. 672).

63 SEN, R. Surfactin: biosynthesis, genetics and potential applications. In: Sen, R. (Ed.). **Biosurfactants**. New York: Springer, 2010. p. 316-323. (Advances in experimental medicine and biology, v. 672).

64 PATHAK, K.V.; KEHARIA, H. Application of extracellular lipopeptide biosurfactant produced by endophytic *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) in microbially enhanced oil recovery (MEOR). **3 Biotech**, v. 4, n. 1, p. 41–48, 2014. doi: 10.1007/s13205-013-0119-3.

65 YAKIMOV, M.M.; TIMMIS, K.N.; WRAY, V.; FREDERICKSON, H.L. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1706–1713, 1995.

66 MAKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.18, n. 1, p. 37-42, 1997.

67 SAKTHIPRIYA, N.; DOBLE, M.; SANGWAI, J. S. Action of biosurfactant producing thermophilic *Bacillus subtilis* on waxy crude oil and long chain paraffins. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 105, p. 168-177, 2015. doi: 10.1016/j.ibiod.2015.09.004

68 ALVAREZ, V.M.; JURELEVICIUS, D.; MARQUESA, J.M.; SOUZA, P.M.; ARAÚJO, L.V.; BARROS, T.G.; SOUZA, R.O.M.A.; FREIRE, D.M.G.F; SELDIN, L. *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 14–21, 2015. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.08.046.

69 ATLAS, R.M. **Handbook of microbiological media**. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, 2010.

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

71 BRUMANO, L.P.; ÂNGELO, F.F.; AMARAL, L.H.; PINTO, C.L.O.; ALMEIDA, J.A.; PINTO, M.A.O. Estirpes bacterianas-padrão, formas de obtenção de doação e sua manutenção em laboratórios de ensino e pesquisa. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 3, n. único, p. 21-26, 2011.

72 LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: Wiley, 1991. p. 115-175.

73 SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989. v.1.

74 OLIVEIRA, T. F.; FERREIRA, J.S.; BOA SORTE, P.M.F.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; SCHWAB, S. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**: concentração mínima inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia. Seropédica: EMBRAPA, 2009. 16 p.

75 ANDREWS, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 5-16, 2001. Supplement 1.

76 DASTGHEIB, S.M.M.; AMOOZEGAR, M.A.; ELAHI, E.;ASAD, S.; BANAT, I.M. Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 2, p. 263-270, 2008.

77 MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 4, p. 428-434, 2002.

78 AGARWAL, P.; SHARMA, D.K. Studies on the production of biosurfactant for the microbial enhanced oil recovery by using bacteria isolated from oil contaminated wet soil. **Petroleum Science and Technology**, v. 27, n. 16, p. 1880-1893, 2009.

79 DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, n. 6, p.1675-1684, 2008.

80 JAIN, D.K.; COLLINS-THOMPSON, D.L.; LEE, H.; TREVORS, J.T.A dropp colapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v.13, n. 4, p.271-279, 1991.

81 BODOUR, A.A.; MILLER-MAIER, R.M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, n. 3, p.273-280, 1998.

82 BAE, S.S.; LEE, J.H.; KIM, S.J. *Bacillus alveayuensis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from deep-sea sediments of the Ayu Trough. **International**

Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 55, n. 3, p. 1211-1215, 2005.

83 ADDOU, A.N.; SCHUMANN, P.; SPRÖER, C.; BOUANANE-DARENFED, A.; AMAROUICHE-YALA, S.; HACENE, H.; CAYOL, J.L.; FARDEAU, M.L. *Melghirimyces thermohalophilus* sp. nov., a thermoactinomycete isolated from an Algerian salt lake. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 5, p.1717-1722, 2013.

84 DABBOUSSI, F.; HAMZE, M.; ELOMARI, M.; VERHILLE, S.; BAIDA, N.; IZARD, D.; LECLERC, H. *Pseudomonas libanensis* sp. nov., a new species isolated from Lebanese spring waters. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 1091-1101, 1999.

85 MATSUO, Y.; KATSUTA, A.; MATSUDA, S.; SHIZURI, Y.; YOKOTA, A.; KASAI, H. *Mechercharimyces mesophilus* gen. nov., sp. nov. and *Mechercharimyces asporophorigenens* sp. nov., antitumour substance-producing marine bacteria, and description of Thermoactinomycetaceae fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 12, p. 2837-2842, 2006.

86 MATSUO, Y.; KANO, K.; YAMORI, T.; KASAI, H.; KATSUTA, A.; ADACHI, K.; SHIN-YA, K.; SHIZURI, Y. Urukthapelstatin A, a Novel Cytotoxic Substance from Marine-derived *Mechercharimyces asporophorigenens* YM11-542. **Journal of Antibiotics**, v. 60, n. 4, p. 251–255, 2007.

87 SATPUTE, S.K.; BHUYAN, S.S.; PARDESI, K.R.; MUJUMDAR, S.S.; DHAKEPHALKAR, P.K.; SHETE, A.M.; CHOPADE, B.A. Molecular genetics of biosurfactant synthesis in microorganisms. In: SEN, R. (Ed.). **Biosurfactants**. New York: Springer, 2010. p. 14-41. (Advances in experimental medicine and biology, v. 672).

88 ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 488-494, 1968.

89 BANAT, I.M. The isolation of thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 6, p. 591-594, 1993.

90 SAINI, H.S.; BARRAGÁN-HUERTA, B.E.; LEBRÓN-PALER, A.; PEMBERTON, J.E.; VÁZQUEZ, R.R.; BURNS, A.M.; MARRON, M.T.; SELIGA, C.J.; GUNATILAKA, A.A.; MAIER, R.M. Efficient purification of the biosurfactant viscosin from *Pseudomonas libanensis* strain M9-3 and its physicochemical and biological properties. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 6, p. 1011-1015, 2008.

91 MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia médica**. Tradução de Andreza Martins. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

92 FONSECA, R.R.; SILVA, A.J.R.; FRANÇA, F.P.; CARDOSO, V.L.; SÉRVULO, E.F.C. Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus*

subtilis strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137, n. 1-12, p. 471-486, 2007.

93 FARIA, A.F.; TEODORO-MARTINEZ, D.S.; BARBOSA, G.N.O.; VAZ, B.G.; SILVA, Í.S.; GARCIA, J.S.; TÓTOLA, M.R.; EBERLIN, M.N.; GROSSMAN, M.; ALVES, O.L.; DURRANT, L.R. Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 1951-1957, 2011.

94 PRADHAN, A.K.; PRADHAN, N.; MALL, G.; PANDA, H.T.; SUKLA, L.B.; PANDA, P.K.; MISHRA, B.K. Application of lipopeptide biosurfactant isolated from a halophile: *Bacillus tequilensis* CH for inhibition of biofilm. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 6, p. 1362-1375, 2013.

95 WEI, Y.H.; CHOU, C.L.; CHANG, J.S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, n. 2, p. 146–154, 2005.

96 FONTES, G.C.; AMARAL, P.F.F.; NELE, M.; COELHO, M.A.Z. Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010. doi: 10.1155/2010/821306.

97 AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A.Z.; MARRUCHO, I.M.J.; COUTINHO, J.A.P. Biosurfactants from Yeasts: characteristics, production and application. In: SEN, R. **Biosurfactants**. New York: Springer, 2010. p. 236-249. (Advances in experimental medicine and biology, v. 672).

98 SAIKIA, R.R.; DEKA, H.; GOSWAMI, D.; LAHKAR, J.; BORAH, S.N.; PATOWARY, K.; BARUAH, P.; DEKA, S. Achieving the best yield in glycolipid biosurfactant preparation by selecting the proper carbon/nitrogen ratio. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 17, n. 3, p. 563-571, 2014.

99 DAVIS, D.A.; LYNCH, H.C.; VARLEY, J. The production of Surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 3-5, p. 322–329, 1999.

100 MUKHERJEE, A.K.; DAS, K. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, n. 3, p. 479-789, 2005.

101 ZHAO, P.; QUAN, C.; JIN, L.; WANG, L.; WANG, J.; FAN, S. Effects of critical medium components on the production of antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 exhibiting excellent biosurfactant properties. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 401–409, 2013.

102 HUANG, X.; LIU, J.; WANG, Y.; LIU, J.; LU, L. The positive effects of Mn^{2+} on nitrogen use and surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 381-389, 2015.

- 103 POTVIN, J.; PAUL, P. Ammonium regulation in *Saccharopolyspora erythraea*. part II: regulatory effects under different nutritional conditions. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 1, p. 69-74, 1994.
- 104 DUVNJAK, Z.; KOSARIC, N. Production and release of surfactant by *Corynebacterium lepus* in hydrocarbon and glucose media. **Biotechnology Letters**, v. 7, n. 11, p. 793-796, 1985.
- 105 PEREIRA, J.F.B.; GUDIÑA, E.J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEIXEIRA, J.A.; COUTINHO, J.A.P.; RODRIGUES, L.R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Fuel**, v. 111, p. 259-268, 2013. doi:10.1016/j.fuel.2013.04.040.
- 106 CHANDANKERE, R.; YAO, J.; CHOI, M.M.F.; MASAKORALA, K.; CHAN, Y. An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa isolated from petroleum reservoir. **Biochemical Engineering Journal**, v. 74, p. 46–53, 2013. doi:10.1016/j.bej.2013.02.018.
- 107 ZHOU, H.; CHEN, J.; YANG, Z.; QIN, B.; LI, Y.; KONG, X. Biosurfactant production and characterization of *Bacillus* sp. ZG0427 isolated from oil-contaminated soil. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 2255-2264, 2015.
- 108 YAKIMOV, M.M.; AMRO, M.M.; BOCK, M.; BOSEKER, K.; FREDRICKSON, H.L.; KESSEL, D.G.; TIMMIS, K.N. The potential of *Bacillus licheniformis* strains for in situ enhanced oil recovery. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 18, n. 1-2, p. 147-160, 1997.
- 109 VILELA, W.F.D.; FONSECA, S.G.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V.M.; NITSCHKE, M. Production and properties of a surface-active lipopeptide produced by a new marine *Brevibacterium luteolum* strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 6, p. 2245-2256, 2014.
- 110 CORONEL-LEÓN, J.; GRAU, G.; GRAU-CAMPISTANY, A.; FARFAN, M.; RABANAL, F.; MANRESA, A.; MARQUÉS, A.M. Biosurfactant production by AL 1.1, a *Bacillus licheniformis* strain isolated from Antarctica: production, chemical characterization and properties. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 2065-2078, 2015.
- 111 SCHALLER, K.D.; FOX, S.L.; BRUHN, D.F.; NOAH, K.S.; BALA, G.A. Characterization of surfactin from *Bacillus subtilis* for application as an agent for enhanced oil recovery. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 115, n. 1, p. 827-836, 2004.
- 112 KIRAN, G.S.; THOMAS, T.A.; SELVIN, J. Production of a new glycolipid biosurfactant from marine *Nocardiopsis lucentensis* MSA04 in solid-state cultivation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 78, n. 1, p. 8-16, 2010.
- 113 KIRAN, G.S.; THOMAS, T.A.; SELVIN, J.; SABARATHNAM, B.; LIPTON, A.P. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by

marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2389–2396, 2010.

114 AMANI, H.; SARRAFZADEH, M.H.; HAGHIGHI, M.; MEHRNIA, M.R. Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 75, n. 1-2, p. 209–214, 2010.

115 HABA, E.; ESPUNY, M.J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 3, p. 379–387, 2000.

116 VOLLENBROICH, D.; OZEL, M.; VATER, J.; KAMP, R.M.; PAULI, G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. **Biologicals**, v. 25, n. 3, p. 289–297, 1997.

117 CAMEOTRA, S.S.; MAKAR, R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 262-266, 2004.

118 RODRIGUES, L.; BANAT, I. M.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Biosurfactants: potential applications in medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 609–618, 2006.

119 VELRAEDS, M.M.C.; VAN DER MEI, H.C.; REID, G.; BUSSCHER, H.J. Physicochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by *Lactobacillus* strains. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 8, n. 1-2, p. 51-61, 1996.

120 NARUSE, N.; TENMYO, O.; KOBARU, S.; KAMEI, H.; MIYAKI, T.; KONISHI, M.; OKI, T. Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics: production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. **Journal of Antibiotics**, v. 43, n. 3, p. 267-280, 1990.

121 TANAKA, Y.; TAKASHI, T.; KAZUHIK, U.; YASUSHI, U.; JUN, U. Method of producing iturin a and antifungal agent for profound mycosis. **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 1, p. 234–235, 1997.

122 MIZUMOTO, S.; HIRAI, M.; SHODA, M. Enhanced enhanced iturin a production by *Bacillus subtilis* and its effect on suppression of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 6, p. 1267–1274, 2007.

123 WEI, Y.H.; WANG, L.C.; CHEN, W.C.; CHEN, S.Y. Production and characterization of fengycin by *Indigenous Bacillus subtilis* F29-3 Originating from a potato farm. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 11, p. 4526-4538, 2010.