UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

GABRIELLE CRISTINA COSTA

Biossurfactante produzido por uma linhagem bacteriana isolada de reservatório de petróleo: produção e avaliação da propriedade tensoativa

São Carlos

2020

GABRIELLE CRISTINA COSTA

Biossurfactante produzido por uma linhagem bacteriana isolada de reservatório de petróleo: produção e avaliação da propriedade tensoativa

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

2020

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.

Costa, Gabrielle Cristina

Biossurfactante produzido por uma linhagem bacteriana isolada de reservatório de petróleo: produção e avaliação da propriedade tensoativa / Gabrielle Cristina Costa; orientadora Nelma Regina Segnini Bossolan -- São Carlos, 2020.

131 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2020.

1. Bacillus. 2. Termófilo. 3. Halófilo. 4. MBOR. 5. Lipopeptídeo. I. Bossolan, Nelma Regina Segnini, orient.
II. Título.

Aos meus pais,
Lucilene P. C. Costa e Karl Georg Costa

AGRADECIMENTOS

À professora Profa. Dra. Nelma Regina Segnini Bossolan, pela orientação, paciência e ensinamentos prestados.

Aos meus pais, Lucilene e Karl Georg, por todo carinho, dedicação e ajuda nos momentos mais difíceis.

Aos meus colegas do laboratório, Marcela, Jakeline, e Tatiana por toda ajuda, ensinamentos e momentos compartilhados.

Aos meus amigos Alexandre e Victória por me apoiarem em todos os momentos difíceis.

Ao Laboratório de Biofísica, Grupo Sérgio Mascarenhas e a ao Instituto de Física de São Carlos - USP por todo o suporte e infra-estrutura fundamental ao desenvolvimento deste trabalho.

À Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), à PETROBRAS S/A, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro do projeto e pela bolsa de mestrado.

À Dra. Rafaely Nascimento Lima pela realização das medidas de Cromatografia a Gás/Espectrometria de Massas-CG-EM.

Ao EESCoBar e a Agropecuária Indústria e Comércio Búfalo Brasil LTDA. por ceder resíduos testados no projeto.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente com a realização deste trabalho, meu MUITO OBRIGADA!

“A ciência atua na fronteira entre conhecimento e ignorância sem medo de admitir que não sabemos. Não há vergonha nisso. A única vergonha é fingir que temos todas as respostas.”
Neil deGrasse Tyson

RESUMO

COSTA, G. C. **Biossurfactante produzido por uma linhagem bacteriana isolada de reservatório de petróleo:** produção e avaliação da propriedade tensoativa. 2020. 131 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Biossurfactantes (BS) são moléculas de caráter anfipático produzidas por uma grande variedade de microrganismos, possuindo atividade redutora de tensão superficial e interfacial e exibindo ação emulsificante. São potencialmente aplicáveis em vários setores industriais e ambientais pois podem ser produzidos a partir de substratos renováveis de baixo custo. Possuem características superiores aos surfactantes sintéticos: são biodegradáveis, apresentam baixa toxicidade e possuem atividade específica em extremos de temperatura, salinidade e pH. Um dos maiores mercados para biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados principalmente em processos de recuperação terciária do petróleo. As condições extremas presentes em reservatórios de petróleo geram uma demanda por estudos sobre a produção de BS em tais condições, envolvendo tanto sua estabilidade neste ambiente como a produção de BS por bactérias nativas do reservatório. Nesse contexto, este trabalho propôs o estudo de uma linhagem bacteriana (Ar70C2) isolada a partir de amostras rochosas de um reservatório para uma futura aplicação em processos de recuperação melhorada de petróleo utilizando-se microrganismos e/ou seus produtos (MEOR). A linhagem foi identificada pelo sequenciamento do rRNA 16s, apresentando uma similaridade de 99,9% com *Bacillus alveayuensis*, e com ela foram conduzidos estudos crescimento e produção de BS alterando-se fatores como salinidade, agitação, temperatura, fontes de carbono (C), fontes de nitrogênio (N) e relação C/N. O cultivo em Meio Mineral (MM), com a salinidade de 35 g/L de NaCl, adicionado de glicerina vegetal (2g/L) e nitrato de sódio (0,5 g/L), na relação C/N=4, na presença de solução de elementos-traço e incubado a 55°C, forneceu resultados mais expressivos em termos de índice de emulsificação E_{24} (62,54%) e de produção de massa de BS (extrato semi-purificado) (0,14 g/L de MM). O BS semi-purificado teve sua estabilidade testada em condições diversas de salinidade, pH e temperatura. O BS apresentou estabilidade térmica no intervalo de -18 a 121°C registrando valores médios de E_{24} de 50,00% ($\pm 5,97$) (80°C) e 61,29% ($\pm 3,64$) (4°C). As amostras de BS tiveram seu pH ajustado para valores entre 2 a 12, fornecendo valores de E_{24} que variaram de 51,74% ($\pm 2,01$) (pH 8) a 59,12% ($\pm 4,78$) (pH 7). Quanto à salinidade, as amostras foram ajustadas para concentrações no intervalo de 0 a 21% de NaCl e os valores de E_{24} obtidos variaram de 49,44% ($\pm 1,11$) (9% de NaCl) a 58,88% ($\pm 1,11$) (3% de NaCl). O BS semi-purificado foi analisado para a

quantificação total de proteínas, por método colorimétrico (*BCA Protein Assay Kit*), e para a determinação de ácidos graxos, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). A porcentagem de proteína presente na amostra foi de 58,51% e a análise de ácidos graxos resultou em uma mistura de ácidos com cadeias contendo de 15 a 20 átomos de carbono, com predominância de ácidos graxos com 18 átomos de carbono. O isolado Ar70C2 produziu um BS de natureza lipopeptídica, com expressiva propriedade emulsificante em condições termofílicas e halofílicas. Essas características, juntamente com a boa capacidade emulsificante em diversos substratos orgânicos e estabilidade sob variações de pH, salinidade e temperatura, sugerem uma potencial aplicação em MEOR.

Palavras chave: *Bacillus*. Termófilo. Halófilo. MEOR. Lipopeptídeo.

ABSTRACT

COSTA, G. C. **Biosurfactant produced by a bacterial strain isolated from an oil reservoir:** production and evaluation of its surface-active property. 2020. 131 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020

Biosurfactants (BS) are amphipathic molecules produced by a wide variety of microorganisms, which are capable of reducing surface and interfacial tension and exhibit emulsifying activity. They are potentially applicable in many industrial and environmental sectors as they can be produced from low cost renewable substrates. They have characteristics superior to synthetic surfactants: they are biodegradable, have low toxicity and have specific activity at extremes of temperature, salinity and pH. One of the largest markets for biosurfactants is the oil industry, where they are mainly used in tertiary oil recovery processes. The extreme conditions present in oil reservoirs generate a demand for studies on BS production under such conditions, involving both its stability in this environment and the production of BS by indigenous bacteria. In this context, the aim of this work was to study a bacterial strain (Ar70C2) isolated from reservoir rock samples for its future application in microbial enhanced oil recovery (MEOR) processes. The strain was identified by 16s rRNA sequencing, showing 99.9% similarity with *Bacillus alveayuensis*, and growth and BS production studies were carried out changing factors such as salinity, agitation, temperature, carbon sources (C), nitrogen sources (N) and C/N ratio. Cultivation in Mineral Medium (MM), with salinity of 35 g/L NaCl, added vegetable glycerin (2 g/L), sodium nitrate (0.5 g/L) and trace-elements solution, incubated at 55 °C, gave more expressive results in terms of E₂₄ emulsification index (62.54%) and BS (semi-purified extract) mass production (0.14 g/L MM). Semi-purified BS was tested for stability under different salinity, pH and temperature conditions. The BS presented thermal stability in the range of -18 to 121 °C registering mean E₂₄ values of 50.00% ($\pm$ 5.97) (80 °C) and 61.29% ($\pm$ 3.64) (4 °C). The BS samples had their pH adjusted to values between 2 and 12, providing E₂₄ values ranging from 51.74% ($\pm$ 2.01) (pH 8) to 59.12% ($\pm$ 4.78) (pH 7). As for salinity, the samples were adjusted to concentrations ranging from 0 to 21% NaCl and the obtained E₂₄ values ranged from 49.44% ($\pm$ 1.11) (9% NaCl) to 58.88% ($\pm$ 1.11) (3% NaCl). Semi-purified BS was analyzed for total protein quantification by colorimetric method (BCA Protein Assay Kit) and for fatty acid determination by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The percentage of protein present in the sample was 58.51% and the fatty acid analysis resulted in

a mixture of acids with chains containing 15 to 20 carbon atoms, with a predominance of 18 carbon atoms. Strain Ar70C2 produced a lipopeptide BS with significant emulsifying property under thermophilic and halophilic conditions. These characteristics, together with the good emulsifying capacity on various organic substrates and stability under pH, salinity and temperature variations, suggest a potential application in MEOR.

Keywords: *Bacillus*. Thermophile. Halophile. MEOR. Lipopeptide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de uma molécula de Surfactante.	21
Figura 2 - Gráfico demonstrando a dependência da concentração de BS com a redução da tensão superficial. Nota-se que quando o BS atinge a CMC não ocorre mais alterações na tensão superficial.	24
Figura 3 - Técnicas de recuperação avançadas mais utilizados na indústria do petróleo.	31
Figura 4 - Esquema demonstrando o processo de MEOR. a) Antes do processo MEOR: o óleo está preso no arenito poroso. A água flui sem remover as gotículas de óleo dos pequenos espaços dos poros na rocha. b) Após o processo MEOR: os microrganismos circundam as gotículas de óleo e produzem substâncias tensoativas que auxiliam na redução da tensão interfacial óleo/rocha, resultando na movimentação do óleo para fora dos poros.	33
Figura 5 - Diagrama da estrutura clássica das surfactinas.	35
Figura 6 - Diagrama da estrutura clássica de iturinas.	35
Figura 7 - Diagrama da estrutura clássica das fengicinas.	35
Figura 8 - Fluxograma representando as etapas experimentais realizadas nesse trabalho. Na figura: E ₂₄ representa o índice de emulsificação, DO a densidade óptica, TS a tensão superficial, Massa de BS é o rendimento total de BS obtido (em g/L de meio de cultura), C/N, onde C é Carbono e N é Nitrogênio.	48
Figura 9 - Foto mostrando a emulsão formada como resultado do teste do E ₂₄	49
Figura 10- Fluxograma que resume as etapas realizadas no teste para avaliar o crescimento e a produção de BS em diferentes de temperaturas.	55
Figura 11 - Resumos dos testes para seleção da fonte de nitrogênio.	59
Figura 12- Cultivos realizados com as fontes de nitrogênio testadas, utilizando fontes de carbono selecionadas em teste anterior.	59
Figura 13 - Porcentagem de identidade da sequência completa do gene RNAr16S da linhagem Ar70C2 com a de outros microrganismos (das bases de dados EMBL ou RDP).	67
Figura 14 - Árvore filogenética construída com sequências de rRNA16S total da Ar70C2 e sequencias parciais dos outros microrganismos. Pode-se notar	

<p>a forte relação entre as linhagens Ar70C2 e o <i>B. alveayuensis</i> TM1 e algumas outras próximas do gênero <i>Bacillus</i>.</p>	68
<p>Figura 15 - Resultado da análise de ácidos graxos celulares feita pela empresa DSMZ para o isolado em estudo. Fonte: Elaborada pela autora.....</p>	73
<p>Figura 16 - Imagem da coloração de Gram da linhagem Ar70C2.</p>	74
<p>Figura 17 - Imagem da coloração de Gram das bactérias controles, <i>Escherichia coli</i> e <i>Bacillus subtilis</i>.</p>	74
<p>Figura 18 – Imagem da coloração de esporos do controle positivo <i>Bacillus subtilis</i>.</p>	75
<p>Figura 19 - Imagem da coloração de esporos da linhagem Ar70C2.</p>	75
<p>Figura 20 -Medidas de crescimento (densidade óptica – DO) e índices de emulsificação (E₂₄) registradas a partir dos cultivos da linhagem Ar70C2 em diferentes salinidades (5, 25, 40, e 75 g/L de NaCl).</p>	77
<p>Figura 21 - Medidas de crescimento (DO) e índices de emulsificação (E₂₄) dos cultivos da linhagem Ar70C2 em MM, nas condições estática (a) e em agitação de 100 rpm (b).....</p>	78
<p>Figura 22 - Resultados do teste de fonte de carbono para o isolado Ar70C2, estático, sem (a) e com (b) extrato de levedura (EL).</p>	80
<p>Figura 23 - Resultados do teste de fonte de carbono para o isolado Ar70C2, em agitação de 100 rpm, sem (a) e com (b) extrato de levedura (EL).</p>	81
<p>Figura 24 - Crescimento da linhagem Ar70C2 registrado em cultivos nas temperaturas de 37, 45, 55 e 65°C, em caldo LB com salinidade de 35g/L de NaCl.....</p>	84
<p>Figura 25 - Crescimento (DO) e índice de emulsificação (E₂₄) registrados em cultivos da linhagem Ar70C2 nas temperaturas de 55, 65 e 70°C, em caldo LB com salinidade de 35g/L de NaCl.</p>	85
<p>Figura 26 - Crescimento e índice de emulsificação (E₂₄) registrados em cultivos da linhagem Ar70C2 nas temperaturas de 55 e 65°C, em caldo LB com salinidade de 35g/L de NaCl.</p>	86
<p>Figura 27 - Resultados de densidade óptica (DO) e de índice de emulsificação E₂₄ registrados a partir dos cultivos da linhagem Ar70C2 em meio mineral com e sem solução-traço.</p>	88
<p>Figura 28 - Resultados de densidade óptica (DO) e de índice de emulsificação E₂₄ registrados a partir dos cultivos da linhagem Ar70C2 em meio mineral</p>	

realizados no teste das fontes de N. Em (a) estão apresentados os resultados para a glicose, em (b) para o melaço e em (c) para a glicerina vegetal.....	91
Figura 29 -Foto do meio de cultura após a precipitação ácida, com a fonte de C glicerina vegetal e fonte de N NaNO_3	94
Figura 30 - Resumo das etapas de otimização do meio de cultura para a produção de BS pelo isolado Ar70C2.	95
Figura 31- Superfície de resposta gerada pelo programa Minitab18, representando as concentrações de NaNO_3 e glicerina que maximizam o E_{24}	98
Figura 32 - Foto da massa seca do BS obtido na condição do Frasco 7, após os processos de precipitação e secagem.	100
Figura 33 - Índices de emulsificação (E_{24}) do BS produzido pela linhagem Ar70C2 quando adicionado a diferentes substratos hidrofóbicos.	102
Figura 34- Resultado do teste de emulsificação utilizando-se o azeite como substrato hidrofóbico. Nos tubos a, b e c (trélicas) observa-se a camada de emulsão formada após a adição de extrato de cultivo de 96 horas livre de células. Nos tubos denominados Controle apenas meio de cultura sem inóculo bacteriano foi adicionado ao azeite, não formando camada de emulsão.	103
Figura 35 - Resultados dos testes de estabilidade do BS, expressos pelo índice E_{24} (%). De cima para baixo, valores registrados de E_{24} em diversas condições de salinidade, pH e temperatura.....	105
Figura 36 - Curva padrão com solução de albumina bovina obtida pelo método BCA para cálculo da quantificação de proteína do biossurfactante.	109
Figura 37 - Cromatograma total da amostra de BS semi-purificado após etanólise.	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classes de BS, seus exemplos e microrganismos produtores.	25
Tabela 2 -	Resumo de vários substratos de baixo custo/renováveis disponíveis em diferentes setores industriais.	38
Tabela 3 -	Delineamento experimental pelo método de composto central de face centrada (CCD). A tabela consiste dos dados gerados pelo programa Minitab® 18 para a otimização das concentrações das fontes de carbono (C) e de nitrogênio (N).	62
Tabela 4 -	Resumo das concentrações das fontes de carbono e de nitrogênio testadas na segunda etapa da otimização da relação C/N. A, B e C correspondem às denominações das réplicas	63
Tabela 5 -	Resultados apresentados pela linhagem Ar70C2 aos testes bioquímicos realizados pela empresa DSMZ. Símbolos: + reação positiva; – reação negativa; w: positivo fraco.	69
Tabela 6 -	Resultados apresentados pela linhagem Ar70C2 no teste API® 50 CH (<i>Analytical Profile Index</i> , testes de fermentação de diferentes carboidratos). Símbolos: + reação positiva, reação negativa, w positivo fraco, ? positivo questionável.	70
Tabela 7 –	Características de três linhagens identificadas como <i>B. alveayuensis</i>	71
Tabela 8 -	Valores médios de tensão superficial (TS, em mN/m) registrados nos caldos livres de células dos cultivos de Ar70C2 mantidos a 55 e 65°C.	87
Tabela 9 -	Valores médios de tensão superficial (TS, em mN/m) registrados nos caldos livres de células dos cultivos de Ar70C2 em meio mineral com (a) e sem solução-traço (b).	88
Tabela 10 –	Valores médios tensão superficial (TS em mN/m, média de triplicatas) registrados nos caldos livres de células obtidos dos cultivos realizados com as fontes de N e C selecionadas, após 144 horas de cultivo.	90
Tabela 11 -	Massa seca de BS e de células, em grama (g), obtidas por precipitação ácida de 1 litro de cultivo.	93
Tabela 12 -	Resultados do índice de emulsificação e da massa, em gramas, do BS produzido nos experimentos de otimização do C/N.	96

Tabela 13 - Ajuste dos resultados obtidos de E ₂₄ nas combinações das concentrações de NaNO ₃ e de glicerina vegetal, utilizando o programa Minitab18	97
Tabela 14 - Valores médios de E ₂₄ , tensão superficial (TS, em mN/m) e massa seca (g/L) do BS produzido nos cultivos da segunda etapa de otimização da relação C/N.....	99
Tabela 15 – Resultados do teste de ANOVA para: (a) valores de E ₂₄ , (b) valores de tensão superficial (TS, mN/m) e (c) massa de BS produzido (g/L)	100
Tabela 16 - Resultados das medidas de absorbância a 562 nm do branco e da amostra para a quantificação de proteínas pelo método de BCA.	109
Tabela 17 - Compostos preditos pela análise cromatográfica do BS semi-purificado.....	110

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Contexto	21
1.2	Surfactantes e Biossurfactantes	21
1.2.1	Natureza química dos biossurfactantes	24
1.2.2	Fatores que influenciam na produção de biossurfactantes	26
1.2.3	Aplicações industriais dos biossurfactantes	28
1.2.4	Aplicação dos biossurfactantes na indústria do petróleo	30
1.3	Biossurfactantes produzidos pelo gênero <i>Bacillus</i>	34
1.4	Uso de fontes de carbono de baixo custo para a produção de BS	37
2	OBJETIVOS	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1	Isolamento da linhagem bacteriana estudada	43
3.2	Identificação e caracterização da linhagem Ar70C2	44
3.2.1	Teste Gram	45
3.2.2	Coloração de esporos	46
3.3	Preparo das culturas de estoque e de trabalho da linhagem Ar70C2	47
3.4	Ensaio de crescimento e de produção de biossurfactante pela linhagem Ar70C2	48
3.4.1	Métodos analíticos	49
3.4.1.1	Determinação do índice de emulsificação E ₂₄	49
3.4.1.2	Extração e obtenção de massa bruta do biossurfactantes	50
3.4.1.3	Determinação da Tensão Superficial (TS) e da Tensão Interfacial (TI)	50
3.4.1.4	Quantificação de proteína total do biossurfactante	51
3.4.1.5	Determinação de ácidos graxos do biossurfactante	51
3.4.2	Teste de Salinidade	52

3.4.3	Teste do meio mineral em cultivos com e sem agitação.....	53
3.4.4	Teste de fontes de Carbono (C).....	54
3.4.5	Teste de Temperatura.....	55
3.4.6	Influência da solução de elementos-traço	57
3.4.7	Teste das fontes de Nitrogênio (N)	58
3.4.8	Otimização da relação C/N	60
3.5	Avaliação da capacidade emulsificante em diferentes substratos orgânicos	63
3.6	Testes de estabilidade do biossurfactante	64
3.7	Análise Estatística	65
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1	Identificação e caracterização da linhagem Ar70C2.....	67
4.2	Teste Gram	74
4.3	Coloração de Esporos.....	75
4.4	Ensaio de crescimento e de produção de biossurfactante pela linhagem Ar70C2	76
4.4.1	Teste de Salinidade	76
4.4.2	Teste do meio mineral em cultivos com e sem agitação.....	77
4.4.3	Teste de fontes de Carbono (C).....	79
4.4.4	Teste de Temperaturas	84
4.4.5	Influência da solução de elementos-traço	88
4.4.6	Teste das fontes de Nitrogênio (N)	90
4.4.7	Otimização da relação Carbono/Nitrogênio (C/N)	95
4.4.8	Avaliação da capacidade emulsificante em diferentes substratos orgânicos	101
4.4.9	Testes de estabilidade do biossurfactante	104
4.4.10	Medida de Tensão Superficial (TS) e Interfacial (TI).....	107
5	CONCLUSÕES.....	113
	REFERÊNCIAS	115

APÊNDICE A – Análises estatísticas referentes ao item 4.4.5 Influência da solução de elementos-traço	127
APÊNDICE B – Análise estatística para a glicose e as fontes de N testadas (item 4.4.6)	127
APÊNDICE C – Análise estatística para a melaço e as fontes de N testadas (item 4.4.6)	128
APÊNDICE D – Análise estatística para a glicerina e as fontes de N testadas (item 4.4.6)	128
APÊNDICE E – Análise estatística para o tempo de cultivo (referente ao item 4.4.6)	129
APÊNDICE F – Análise estatística referente ao item 4.4.7 Otimização da relação carbono/nitrogênio (C/N)	130
ANEXO A - Sherlock Microbial Identification System	131

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contexto

Este trabalho esteve inserido no projeto “Prospecção de linhagens bacterianas produtoras de surfactantes e de enzimas do grupo lipase/esterase em reservatórios de petróleo”, desenvolvido como um Termo de Cooperação entre o Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP) e a PETROBRAS S.A., e coordenado pela Profa. Nelma R. S. Bossolan (IFSC-USP). O referido projeto teve como objetivo avaliar a presença de linhagens bacterianas produtoras de surfactantes a partir de fluidos e amostras de rocha de reservatórios de petróleo *onshore* e *offshore* e também fazer a prospecção de enzimas termoestáveis de interesse industrial, particularmente para a indústria do petróleo. Das linhagens bacterianas isoladas, algumas mostraram-se promissoras com relação à produção de biossurfactante em condições de alta salinidade e temperatura, próximas às encontradas em reservatórios. Uma destas linhagens, isolada de amostra de rocha de um reservatório *offshore* e pertencente ao gênero *Bacillus*, foi avaliada no presente trabalho com relação às condições ótimas de cultivo para a produção máxima de biossurfactante, com vista à aplicação em processos de recuperação de petróleo melhorada por microrganismos (MEOR).

1.2 Surfactantes e Biossurfactantes

Os surfactantes são compostos de origem sintética anfifílicos, ou seja, suas moléculas são formadas por duas regiões: uma hidrofílica, denominada cabeça, e outra hidrofóbica, denominada cauda. (Figura 1)

Figura 1 - Esquema de uma molécula de Surfactante.
Fonte: Elaborada pela autora

Devido a esta característica, quando um surfactante está em uma solução constituída

de diferentes graus de polaridade ele tende a distribuir-se nas interfaces. Esta distribuição torna os surfactantes capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial e formar microemulsões, onde os hidrocarbonetos podem solubilizar em água ou onde a água pode solubilizar em hidrocarbonetos.¹

Biossurfactante (BS) é um surfactante natural produzido, principalmente, por microrganismos, tanto bactérias como fungos. São considerados superiores aos surfactantes sintéticos devido a vantagens como: diversidade estrutural, baixa toxicidade, maior biodegradabilidade, capacidade de funcionar em amplas faixas de pH, temperatura e salinidade,² além de maior seletividade e produção envolvendo fontes renováveis como resíduos e subprodutos industriais.

Algumas são as funções fisiológicas atribuídas aos biossurfactantes. Sabe-se que exercem influência sobre a sobrevivência dos microrganismos por estarem relacionados com sua mobilidade e desprendimento de superfícies. Sua função também pode estar relacionada com interações entre as células, formação, manutenção e maturação de biofilmes; patogênese, *quorum sensing* (mecanismo de comunicação entre células, geralmente estimulada por mudanças ambientais e populacionais) e inibição do crescimento de outras populações microbianas. Seu papel também está intimamente relacionado com a capacidade de crescimento dos microrganismos em ambientes formados, principalmente, por compostos imiscíveis em água, como hidrocarbonetos. A partir do momento que o BS é secretado ele atua na diminuição da tensão superficial, o que ajuda a tornar os compostos hidrofóbicos mais disponíveis para o consumo.³

Hommel⁴ destaca três tipos de mecanismos possíveis de captação de hidrocarbonetos por microrganismos: absorção de alcanos monodispersos dissolvidos, contato direto das células com grandes gotas de óleo e contato com gotículas finas de óleo (alcano pseudo-solubilizado). Qualquer que seja o mecanismo envolvido, são necessárias alterações na célula que permitam a sua aderência às gotículas de óleo e, neste último caso, reconhecer o substrato a ser solubilizado.

Primeiramente, os biossurfactantes podem efetivamente aumentar a solubilidade do composto orgânico através da formação de micelas ou vesículas que se associam com os hidrocarbonetos. A seguir, podem facilitar o contato das células ao hidrocarboneto, aumentando a hidrofobicidade da superfície celular, resultando em uma maior atração pelas gotículas emulsificadas de óleo.⁵

Como já mencionado, os biossurfactantes apresentam grande diversidade estrutural. Pode-se classificá-los, primeiramente, em duas grandes categorias referentes ao seu peso molecular: os de baixo peso molecular e os de alto peso molecular. Os de baixo peso molecular estão mais relacionados com a diminuição de tensão superficial, quando colocados em solução aquosa, já os de alto peso molecular (também chamados de bioemulsificantes) estão relacionados com a formação e estabilização de emulsões, podendo ou não atuarem, concomitantemente, na redução de tensão superficial.³

Uma emulsão é definida, basicamente, como uma mistura estável de dois líquidos imiscíveis. Quando estes são colocados em solução ocorre a formação de duas fases, que persistem mesmo após vigorosa agitação. Quando adicionado nesta mistura, o bioemulsificante irá agir possibilitando que a dispersão de um líquido no outro se mantenha estável, portanto, após uma agitação vigorosa as duas fases ainda continuarão misturadas. Para tal feito, a parte polar do bioemulsificante deve ser solúvel no líquido hidrofílico, enquanto que a parte apolar ficará adsorvida na interface do líquido hidrofóbico.

Para melhor entendimento sobre a formação de emulsão e a redução de tensão superficial proporcionada pelos biossurfactantes em solução, é fundamental compreender o conceito de Concentração Micelar Crítica (CMC). Quando monômeros de BS são adicionados em solução, a tensão interfacial ou superficial decresce até a concentração do BS alcançar a CMC. Acima desta, não há mais redução de tensão superficial ou interfacial (Figura 2). Na CMC, os monômeros de BS começam a se associar espontaneamente em estruturas agregadas, tais como micelas, vesículas e lamelas. A CMC para qualquer BS é dependente da estrutura do BS, bem como do pH, força iônica e temperatura da solução.⁶

Figura 2 - Gráfico demonstrando a dependência da concentração de BS com a redução da tensão superficial. Nota-se que quando o BS atinge a CMC não ocorre mais alterações na tensão superficial.

Fonte: CONGRESSO...⁶

1.2.1 Natureza química dos biossurfactantes

Ao contrário dos surfactantes químicos, que são classificados de acordo com a natureza de seu grupamento polar, os biossurfactantes são categorizados, principalmente, por sua composição química e sua origem microbiana. Em geral, sua estrutura inclui uma porção hidrofílica que consiste em aminoácidos ou peptídeos, ânions ou cátions; mono-, di- ou polissacarídeos; e a porção hidrofóbica constituída de ácidos insaturados, saturados ou graxos. Assim, as principais classes de biossurfactantes incluem: glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados.¹

Os principais tipos de biossurfactantes, espécies produtoras e exemplos estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Classes de BS, seus exemplos e microrganismos produtores.

Classe do BS	Exemplo	Microrganismos produtores
Glicolipídeos	Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas</i> sp <i>P. aeruginosa</i>
	Trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Mycobacterium</i> sp
	Celobiolipídeos	<i>Ustilago maydis</i> <i>U. zeae</i>
	Sorolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>T. apicola</i> <i>T. petrophilum</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	Peptídeo-lipídeo	<i>B. licheniformis</i>
	Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
	Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
	Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
	Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos	Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
	Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
	Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Biodispersan	<i>Candida lipolytica</i>
	Liposan	
	Carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Manana-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes Particulados	Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Células	Várias bactérias

Fonte: DESAI; BANAT¹

Entre todas as classes de BS, a dos glicolipídeos é a mais conhecida e estudada. São carboidratos combinados com cadeias longas de ácidos alifáticos ou hidroxialifáticos. Os lipopeptídeos e lipoproteínas apresentam uma porção de proteína e outra de ácido graxo. A

porção de proteína pode ser neutra ou aniônica e os aminoácidos podem estar arrançados em uma estrutura cíclica, este grupo é bem conhecido devido suas propriedades antimicrobianas.⁵

Os ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos fazem parte da estrutura celular e também apresentam propriedades biossurfactantes. Os biossurfactantes poliméricos são caracterizados pelo seu alto peso molecular. Estes polímeros podem ser grandes cadeias de carboidratos ou de proteínas, podendo ter uma fração lipídica; em alguns casos, o polímero pode ser uma mistura de carboidratos, proteínas e lipídeos. Esses compostos apresentam marcada atividade emulsificante.⁵

Por fim, os biossurfactantes particulados podem apresentar uma importante função na formação de vesículas de membrana extracelular; estas particionam hidrocarbonetos para formar microemulsões que desempenham um papel importante na captação de alcanos pelas células microbianas.¹

1.2.2 Fatores que influenciam na produção de biossurfactantes

O tipo e a quantidade de BS produzidos não dependem somente da linhagem produtora, mas também das condições de cultivo, assim como o da natureza da fonte de carbono (C), da fonte de nitrogênio (N) e da relação C/N. Limitações nutricionais e parâmetros químicos e físicos, tais como temperatura, aeração, presença de cátions divalentes e pH, também influenciam.⁷

Makkar e Cameotra investigaram a influência da fonte de carbono para produção de BS por *Bacillus subtilis* MTCC 2423 medindo a tensão superficial do caldo da cultura livre de células. A redução da tensão superficial foi melhor quando glicose, sacarose, citrato de sódio, piruvato de sódio, extrato de levedura e extrato de carne foram utilizados como fontes de carbono.⁸

Das e colaboradores⁹ utilizaram diferentes substratos de carbono, miscíveis e imiscíveis em água, para estudar a capacidade de crescimento e produção de BS da linhagem de *Bacillus circulans*. Os autores encontraram que substratos solúveis em água como glicose, sacarose, amido e glicerol sustentam tanto o crescimento quanto a produção de biossurfactante. Outros substratos, como o gluconato de sódio, o citrato de sódio, extrato de levedura e o extrato de carne, promoveram o crescimento, enquanto a produção de BS foi insignificante ou ausente.

O nitrogênio é importante no meio de produção de BS, pois é essencial para o crescimento microbiano, uma vez que as sínteses de proteínas e enzimas dependem dele.

Vários compostos nitrogenados, como extrato de levedura, nitrato de amônio, sulfato de amônio, peptona-ureia, nitrato de sódio, extrato de carne e malte, têm sido utilizados para a produção de biossurfactantes. Verificou-se que o extrato de levedura é a fonte de nitrogênio mais utilizada na produção de biossurfactantes.¹⁰

Fatores ambientais são extremamente importantes no rendimento e nas características do BS produzido. Para obter grandes quantidades de BS, é sempre necessário otimizar o bioprocessamento, pois o produto pode ser afetado por mudanças de temperatura, pH, aeração ou velocidade de agitação. A maioria das produções de biossurfactantes é relatada como sendo realizada em uma faixa de temperatura de 25-30°C¹. O efeito do pH inicial no crescimento e produção de emulsificante por uma levedura marinha foi estudado por Zinjarde e Pant,¹¹ que relataram que a melhor produção ocorreu quando o pH foi 8,0, que é o pH natural da água do mar.

Tanto a aeração quanto a agitação facilitam a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase aquosa do meio de cultivo. Então, esses são fatores significativos que influenciam a produção de biossurfactantes. Adamczak e Bednarski¹² observaram que o melhor valor de produção do surfactante (45,5g/L) foi obtido para *Candida antarctica*, quando o fluxo de ar foi de 1vvm (relação ao volume do meio) e a concentração de oxigênio dissolvido foi mantida a 50% da saturação.

A produção de BS também pode ocorrer de maneira ótima na ausência de agitação, como estudado por Dastgheib e colaboradores¹³ para uma espécie de *Bacillus* (linhagem ACO1). Neste caso, o efeito da condição de aeração no crescimento e na produção de BS foi examinado sob três condições de cultura: estática (sem agitação), em agitação (aeróbica) e anaeróbica. No caso dos testes aeróbicos, os frascos de cultura foram mantidos em um *shaker* rotativo na velocidade de 150 rpm. Os resultados revelaram que a linhagem ACO1 foi capaz de crescer sob diferentes níveis de O₂, mas a produção de BS foi ótima apenas na condição estática.

Guerra-Santos e colaboradores¹⁴⁻¹⁵ mostraram a influência da relação C/N na produção de BS por *Pseudomonas aeruginosa*. A produção máxima de ramnolipídeo ocorreu após a limitação de nitrogênio em uma relação C/N de 16/1 a 18/1, e nenhuma produção de BS abaixo de uma relação C/N de 11/1, onde a cultura não foi limitada pelo nitrogênio. Segundo Hommel e colaboradores¹⁶ é a quantidade absoluta de nitrogênio e não sua concentração relativa que parece ser importante para o rendimento ótimo de biomassa, enquanto a concentração de fonte de carbono hidrofóbico determina a conversão de carbono disponível

para o BS.

A síntese de biossurfactantes por *B. subtilis* SPB1 foi investigada por Ghribi e Ellouze-Chaabouni¹⁷ através da variação da relação C/N. Ao utilizarem uma fonte inorgânica de nitrogênio (NH₄Cl), os autores observaram um aumento significativo da produção de biossurfactante até uma C/N de 7, atingindo um rendimento de 900 mg/L de BS. Além dessa relação C/N, ocorreu uma diminuição da síntese de biossurfactantes.

A otimização das condições de cultura é importante para o progresso de qualquer bioprocessos e, portanto, é imperativo avaliar os requisitos nutricionais para melhorá-lo. A abordagem convencional "um fator por ensaio" empregada para a otimização de meios de cultura é demorada, cara e muitas vezes impraticável quando há um grande número de variáveis que precisa ser investigado. Uma alternativa para a abordagem convencional é otimização estatística; esta facilita o desenho de uma visão profunda sobre o efeito interativo de inúmeros fatores que influenciam os processos. Entre os métodos estatísticos disponíveis, o planejamento fatorial e a análise da superfície de resposta são reconhecidos como ferramentas importantes que permitem a determinação precisa das condições ótimas do processo.¹⁸

Kumar e colaboradores¹⁹ utilizaram o planejamento fatorial e a superfície de resposta para analisar a produção de BS por *Bacillus amyloliquefaciens* RHNK22. Ambas as técnicas foram utilizadas para a escolha de um resíduo agroindustrial para ser utilizado como substrato para a produção de Iturina A e também para a otimização do meio de cultura, analisando as variáveis: concentração de substrato, temperatura, pH, tamanho do inóculo e período de incubação. Como resultado foi selecionado o bolo de óleo de girassol como substrato para a produção de Iturina A e, dentre as variáveis independentes testadas, todas mostraram ter efeito significativo sobre a produção de Iturina A; entretanto, concentração de substrato, período de incubação e pH mostraram efeito mais significativo.

1.2.3 Aplicações industriais dos biossurfactantes

Biossurfactantes podem ter aplicações em diversos setores industriais: no setor agrícola, em detergentes comerciais para roupas, em biopesticidas, na medicina, na indústria de processamento de alimentos, na indústria de cosméticos e na indústria do petróleo.

Na agricultura, uma maneira de aumentar a solubilidade de compostos químicos bioperigosos, como o PAH (hidrocarboneto aromático policíclico), é aplicar biossurfactantes como agentes mobilizadores. Isso aumenta a solubilidade aparente dos Contaminantes

Orgânicos Hidrofóbicos (HOC). Também se diz que os biossurfactantes ajudam os microrganismos a absorver as partículas do solo contaminadas por poluentes.²⁰

Também na agricultura, os biossurfactantes são utilizados para a hidrofilição de solos pesados para obter uma boa molhabilidade e alcançar distribuição uniforme de fertilizantes no solo. Eles também evitam a aglomeração de certos fertilizantes durante o armazenamento e promovem a disseminação e penetração dos tóxicos em pesticidas.²⁰

Quase todos os tensoativos, um componente importante utilizado nos detergentes de lavanderia comerciais modernos, são quimicamente sintetizados e são tóxicos para os organismos vivos de água doce. A crescente conscientização do público sobre os perigos e riscos ambientais associados aos surfactantes químicos estimulou a busca por substitutos naturais e ecológicos de surfactantes químicos em detergentes para lavanderia. Os biossurfactantes, como o Lipopeptídeo Cíclico (CLP), são estáveis em uma ampla faixa de pH (7-12) e aquecê-los em alta temperatura não resulta em perda de sua propriedade de superfície ativa.²¹ Eles mostraram boa capacidade de formação de emulsão com óleos vegetais e demonstraram excelente compatibilidade e estabilidade com detergentes comerciais para lavanderia, favorecendo sua inclusão na formulação de detergentes de lavanderia.²²

A estratégia convencional de controle de artrópodes envolve aplicações de produtos químicos e pesticidas de amplo espectro que, frequentemente, produzem efeitos indesejáveis. Além disso, o surgimento de populações de insetos resistentes a pesticidas, bem como o aumento dos preços de novos pesticidas químicos, estimulou a busca por novas ferramentas de controle de vetores ecologicamente corretos. Os biossurfactantes lipopeptídicos produzidos por várias bactérias exibem atividade inseticida contra a mosca de fruta *Drosophila melanogaster* e, portanto, podem ser usados como biopesticidas.²³

Os biossurfactantes têm algumas aplicações terapêuticas. Os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* e os lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis* e *B. licheniformis* demonstraram ter atividades antimicrobianas. A surfactina possui várias aplicações farmacológicas, como a inibição da formação de coágulos de fibrina, hemólise e a formação de canais iônicos nas membranas lipídicas. Também foi relatado como tendo uma atividade antitumoral contra as células do carcinoma ascítico de Ehrlich que inibem a adenosina cíclica 3', 5'-monofosfato fosfodiesterase. A iturina, um lipopeptídeo produzido por *B. subtilis*, afeta a morfologia e a estrutura da membrana das células de leveduras, portanto, pode ser considerado um composto antifúngico.²⁴

Biossurfactantes também estão envolvidos na adesão e dessorção microbiana, possuindo potencial para o desenvolvimento de revestimentos biológicos anti-adesivos para materiais, como cateteres, para retardar o início do crescimento do biofilme.²⁴

Os biossurfactantes têm sido utilizados para várias aplicações no processamento de alimentos, mas geralmente desempenham um papel como ingredientes de formulação de alimentos e agentes antiadesivos. Como ingredientes de formulação de alimentos promovem a formação e estabilização de emulsões devido à sua capacidade de diminuir a tensão superficial e interfacial. Também são usados para controlar a aglomeração de glóbulos de gordura, estabilizar sistemas aerados, melhorar a textura e a vida de prateleira de produtos contendo amido, modificar as propriedades reológicas da massa de trigo e melhorar a consistência e textura dos produtos à base de gordura.²⁵

Na indústria de cosméticos os surfactantes podem ser utilizados devido à sua propriedade emulsificante, para formação de espuma, sua capacidade de ligação à água, efeitos de espalhamento e molhabilidade na viscosidade e na consistência dos produtos. Os biossurfactantes têm sido considerados para substituir os surfactantes quimicamente sintetizados no setor de cosméticos. Estes surfactantes também são utilizados como solubilizantes, agentes umectantes, agentes de limpeza, agentes antimicrobianos, mediadores de ação enzimática, em repelentes de insetos, antiácidos, produtos de banho, almofadas de acne, produtos anti-caspa, soluções para lentes de contato, produtos para bebês, rímel, batons, pasta de dente e branqueadores dentais.²⁶

1.2.4 Aplicação dos biossurfactantes na indústria do petróleo

O petróleo bruto está presente em todo o mundo em uma complexa rede capilar de reservatórios em formações geológicas. As tecnologias tradicionais mais utilizadas de recuperação de petróleo estão inseridas dentro das técnicas de recuperação de petróleo quimicamente aprimoradas (CEOR, do inglês Chemical Enhanced Oil Recovery). Estas podem recuperar um máximo de 40 a 45% do óleo em operação. Inicialmente, a recuperação acontece em dois estágios: recuperação primária e secundária. A recuperação primária produz óleo e gás usando a pressão natural do reservatório.²⁷⁻³¹ A recuperação secundária envolve estimular os poços de petróleo pela injeção de fluidos, que aumentam a pressão interna do poço, o que garante um aumento do fluxo de saída de óleo e gás. Várias técnicas foram usadas para injetar fluidos em um reservatório de petróleo para aumentar as forças naturais na recuperação secundária.³⁰ Quando a água é o fluido de injeção, o processo é chamado de

inundação de água. A injeção de gás natural, que é uma opção cara, constitui uma operação, chamada manutenção de pressão.³⁰⁻³¹ Outras técnicas envolvendo meios mecânicos e físicos, como bombeamento e elevação de gás, ajudam na produção de óleo quando a pressão do reservatório se dissipa. Enquanto a recuperação primária produz de 5 a 10% da reserva total, as eficiências de recuperação no estágio secundário variam de 10 a 40% do petróleo existente.²⁹⁻³¹

A terceira etapa dos processos de recuperação avançada do petróleo é conhecida como EOR (*Enhanced Oil Recovery*) e tem como objetivo a recuperação do óleo residual restante nos reservatórios. O fluxograma da Figura 3 mostra os tipos de EOR atualmente empregados na indústria do petróleo.

Figura 3 - Técnicas de recuperação avançadas mais utilizados na indústria do petróleo.

Fonte: Adaptada de SEN³²

Os surfactantes são usados para reduzir a tensão interfacial entre as interfaces óleo/água e óleo/rocha.³³ Os polímeros são utilizados para aumentar a viscosidade no processo de injeção de água. Ácidos, gases e solventes são usados para aumentar a permeabilidade através da rede porosa das rochas e, assim, repressurizar o reservatório de óleo. Uma vez que estes compostos são obtidos a partir da matéria-prima de petróleo após o refinamento, os métodos EOR se mostraram economicamente pouco atraentes, uma vez que os produtos refinados são utilizados para a recuperação de matérias-primas.³² É por este motivo que os pesquisadores buscaram alternativas economicamente viáveis, encontrando-as nos processos de MEOR (*Microbial Enhanced Oil Recovery*), que exploram microrganismos para a

produção de compostos químicos pertencentes às classes acima mencionadas, embora a uma taxa mais lenta e com menores rendimentos. Esta técnica refere-se a métodos de recuperação de petróleo que envolvem o uso de uma população microbiana ou de seus produtos metabólicos, incluindo biossurfactantes, biopolímeros, biomassa, ácidos, solventes, gases e também enzimas para aumentar a recuperação de petróleo de reservatórios esgotados e , prolongando assim sua vida útil.²⁷⁻³¹ Isto ocorre, principalmente, através da redução da tensão interfacial óleo-rocha, reduzindo as forças capilares que impedem a movimentação do óleo através dos poros da rocha; também auxiliam na emulsificação e na quebra dos filmes de óleo das rochas.³³ (Figura 4)

Figura 4 - Esquema demonstrando o processo de MEOR. a) Antes do processo MEOR: o óleo está preso no arenito poroso. A água flui sem remover as gotículas de óleo dos pequenos espaços dos poros na rocha. b) Após o processo MEOR: os microrganismos circundam as gotículas de óleo e produzem substâncias tensoativas que auxiliam na redução da tensão interfacial óleo/rocha, resultando na movimentação do óleo para fora dos poros.

Fonte: Adaptada de SEN³²

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 BS *in situ*. A segunda estratégia trata da adição de nutrientes previamente selecionados nos poços para favorecer o crescimento de microrganismos autóctones produtores de BS. Por fim, o terceiro mecanismo envolve a produção de biossurfactantes em biorreatores *ex situ* com sua posterior injeção nos reservatórios.³⁴ A última estratégia é mais cara devido à necessidade de capital para produção, purificação e introdução do biossurfactante.³⁵

Para ser útil para o MEOR *in situ*, as bactérias devem ser capazes de crescer sob condições ambientais severas encontradas em reservatórios de petróleo, tais como alta temperatura, pressão, salinidade e baixos níveis de oxigênio.³⁶

1.3 Biossurfactantes produzidos pelo gênero *Bacillus*

Dentre a gama de microrganismos produtores de biossurfactantes, o gênero *Bacillus* é amplamente estudado como produtor de BS do tipo lipopeptídeo. Existem exceções, como no caso do *Bacillus megaterium* que produz um glicolipídeo³⁷ e o *Bacillus subtilis* 22BN que produz um ramnolipídeo.³⁸

Os lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* são geralmente classificados em três grupos com base em suas cadeias peptídicas específicas e as estruturas dos ácidos graxos: as famílias surfactina, iturina e fengicina.³⁹

A surfactina foi inicialmente identificada por Arima e colaboradores⁴⁰ a partir do cultivo de *B. subtilis*. É um BS muito potente, sua estrutura típica contém um heptapeptídeo de sequência de aminoácidos: (L)Glu, (L)Leu, (D)Leu, (L)Val, (L)Asp, (D)Leu, (L)Leu (Figura 5). O peptídeo está ligado através uma ligação lactônica a uma cadeia de ácido graxo β -hidróxi, que pode variar entre de 13 a 15 átomos de carbono. Diferentes homólogos de surfactina variam na identidade dos aminoácidos na segunda, quarta e sétima localizações e no número de átomos de carbono na cadeia de ácidos graxos.³⁹

Figura 5 - Diagrama da estrutura clássica das surfactinas.

Fonte: ZHAO³⁹

A iturina também é um lipo-heptapeptídeo cíclico (Figura 6). A sétima posição do heptapeptídeo é uma serina que está ligado por um resíduo de β -aminoácido de uma cadeia de ácido graxo com 14 a 17 átomos de carbono. A sequência de aminoácidos do heptapeptídeo é (L)Asn, (D)Tyr, (D)Asn, (L)Gln, (L)Pro, (D)Asn, (L)Ser.³⁹ Os homólogos, A, C, D e E, possuem diferentes cadeias de ácidos graxos.⁴¹⁻⁴²

Figura 6 - Diagrama da estrutura clássica de iturinas.

Fonte: ZHAO³⁹

A fengicina é outro tipo de lipopeptídeo complexo produzido por *Bacillus*. Além do ácido graxo β -hidróxi com 15 a 19 átomos de carbono, a fengicina é tipicamente composta da cadeia peptídica de sequência de aminoácidos: (L)Glu, (D)Orn, (L)Tyr, (D)Thr, (L)Glu, (D)Ala, (Val), (L)Pro, (L)Gln, (D)Tyr, (L)Ile (Figura 7). A Tyr na posição 3 está ligada à Ile na posição 10 através de uma ligação lactônica, para formar um peptídeo cíclico. Existem duas variantes principais de fengicina, A e B, que diferem na identidade do aminoácido na posição 6.³⁹

Figura 7 - Diagrama da estrutura clássica das fengicinas.

Fonte: ZHAO³⁹

Devido às suas estruturas e composições diversas, os lipopeptídeos produzidos pelo gênero *Bacillus* possuem características anfipáticas que permitem uma variedade de atividades biológicas.

Sua atividade anti-fúngica é de particular interesse. De acordo com relatos recentes, os lipopeptídeos podem apresentar atividade antifúngica em alta concentração, por induzir a formação de poros na membrana celular, e em baixa concentração, por induzir a apoptose. Desta forma, os lipopeptídeos também podem inibir a formação das paredes celulares.³⁹

Park e colaboradores⁴³ mostraram atividades anti-tumorais da surfactina contra algumas células cancerígenas. Os mecanismos atualmente relatados incluem indução de apoptose e interrupção do ciclo celular.

Mukherjee e Das⁴⁴ estudaram duas linhagens de *Bacillus subtilis* (DM-03 e DM-04) que foram isoladas de dois habitats extremamente diferentes: um da comida fermentada tradicional e outro de uma amostra de solo contaminado com petróleo. Ambas as linhagens apresentaram crescimento máximo e produção de BS na presença de dextrose e glicerol, respectivamente. Entre as fontes de nitrogênio testadas, propiciaram melhor crescimento e produção ótima de BS o nitrato de amônia, para a linhagem DM-03, e a triptona para DM-04. A produção ótima de BS foi observada a 45° C e pH 8,0 a 8,2 para a linhagem DM-03, e a 55 °C e pH 7,0 a 7,2 para a linhagem DM-04, mostrando que a temperatura ideal para o crescimento e a produção de BS é específica da linhagem. Ambas as linhagens de *B. subtilis* foram capazes de crescer e produzir biossurfactantes quando suplementadas com 7% (p/v) de NaCl, mas o limite de tolerância ao sal da linhagem DM-04 (até 1,2 M NaCl) foi muito superior comparado com a linhagem DM-03 (até 0,85 M NaCl). Estas linhagens produziram isoformas de lipopeptídeos cíclicos; a análise por espectrometria de massa MALDI-TOF revelou que as isoformas são de iturinas para a linhagem DM-03, e surfactinas para a linhagem DM-04. Estes resultados indicam que a linhagem DM-04 consegue crescer e produzir BS em condições que abrangem altas temperaturas e concentrações de sal, o que a torna uma boa candidata para futuras aplicações em processos de recuperação de petróleo *in situ*.

O BS produzido por *Bacillus licheniformis* R2 foi caracterizado e estudado por Joshi e colaboradores⁴⁵ com a finalidade de utilizá-lo em testes em meio poroso para verificação do aumento da recuperação de petróleo. O BS foi caracterizado como um lipopeptídio, a Liquesina A, e mostrou capacidade de redução de tensão superficial (70 para 28 mN/m), estabilidade em altas temperaturas (80, 85, 95 e 100 °C), em várias concentrações salinas

(com o máximo de 10% de NaCl) e numa ampla faixa de valores de pH (5,0-12,0). Nos testes em meio poroso encharcado de óleo, realizados a 80 °C, o BS bruto promoveu uma recuperação adicional de óleo de 37,1%, revelando potencial para o desenvolvimento de MEOR *ex situ*.

Makkar e Cameotra⁴⁶ estudaram os efeitos de vários fatores no crescimento e na produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* MTCC 2423. Sacarose (2%) e nitrato de potássio (0,3%) foram selecionadas como as melhores fontes de carbono e nitrogênio para o crescimento e produção de BS. O microrganismo é capaz de produzir BS a 45 °C e dentro do intervalo de pH de 4,5 a 10,5. O BS por ele produzido se apresentou-se como termo e pH estável (de 4,0 a 12,0). Estudos de infravermelho, ressonância magnética nuclear e espectroscopia de massa mostraram que o surfactante é idêntico à surfactina. A capacidade do microrganismo de produzir BS sob condições termofílicas, alcalifílicas e halofílicas e o fato de que o BS por ele produzido também ser estável nessas condições o torna um candidato adequado para aplicações de MEOR, tanto *in situ* como *ex situ*.

Uma linhagem de *Bacillus alveayuensis* (Ar70C2-7), isolada do mesmo local amostrado no presente trabalho, foi estudada por Argentin.⁴⁷ As condições ótimas de crescimento e produção de BS selecionadas foram: como fonte de carbono a glicerina e como fonte de nitrogênio o NH₄Cl, em uma relação C/N igual a 2, salinidade de 70 g/L de NaCl e temperatura ótima de 55°C. O BS bruto produzido nessas condições alcançou um índice de emulsificação de 69,10% e um rendimento médio de 0,17 g/L, e apresentou estabilidade frente variações de temperatura (de -18 a 121°C), pH (2,0-12,0) e salinidade (0-21% de NaCl). Estas características, associadas à boa capacidade emulsificante sobre diversos substratos orgânicos, particularmente de derivados de petróleo, sugeriram uma potencial aplicação em processos de MEOR.

1.4 Uso de fontes de carbono de baixo custo para a produção de BS

A economia é, frequentemente, o gargalo dos processos biotecnológicos, especialmente no caso da produção de biossurfactantes. O sucesso de sua produção depende do desenvolvimento de processos mais baratos e do uso de matérias-primas de baixo custo, uma vez que as matérias-primas utilizadas em rotina podem representar de 10 a 30% do custo total de produção do BS⁴⁸. Os biossurfactantes têm que competir com os surfactantes de origem petroquímica em três aspectos: custo, funcionalidade e capacidade de produção para atender a

necessidade da aplicação pretendida. Um alto custo de produção pode ser tolerado para um BS usado em produtos de volume pequeno e preço alto, como em cosméticos e medicamentos. Mas em aplicações como recuperação avançada de petróleo, que exigem volumes grandes de surfactantes de preço baixo, os altos custos são incompatíveis com o seu uso.⁴⁹

Uma possibilidade explorada extensivamente para a redução de custo na produção de BS é o uso de matérias-primas baratas e substratos agroindustriais. Existe uma variedade de matérias-primas baratas (Tabela 2), incluindo óleos derivados de plantas, resíduos de óleos, substâncias amiláceas, soro lácteo e resíduos de destilarias, que tem sido relatadas como suporte à produção de biossurfactantes.⁴⁸

Tabela 2 - Resumo de vários substratos de baixo custo/renováveis disponíveis em diferentes setores industriais.

Fonte industrial	Descartes/resíduos
Resíduos Agroindustriais, resíduos de culturas agrícolas	Farelo, melaço de beterraba, bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo e de arroz, efluente da lavagem de farinha de mandioca, casca de soja, milho, arroz, melaço de cana-de-açúcar.
Gordura Animal	Descarte de sobras
Cultivos agrícolas	Mandioca, batata, batata-doce, soja, beterraba doce, sorgo
Indústria de laticínios	Soro de requeijão, soro de queijo, resíduos de soro
Indústria de destilaria	Efluentes industriais
Indústria de processamento de alimentos	Fritura de óleos e gorduras comestíveis, azeite, cascas de batata, óleo de colza (canola), óleo de semente de girassol, óleos vegetais
Indústria de processamento de frutas	Resíduos de banana, bagaço de maçã e uva, resíduos industriais de cenoura e abacaxi
Fábricas de processamento de óleo	Torta de coco, amendoim e soja; água residual da fábrica de óleo de palmeira e de azeite; farinha de canola, sabão em pó, resíduos de óleo lubrificante

Fonte: BANAT *et al*⁵⁰

Joshi e colaboradores⁵¹ estudaram a produção de BS por *Bacillus licheniformis* K51, *B. subtilis* 20B, *B. subtilis* R1 e *Bacillus* HS3 usando melaço ou soro de queijo como única

fonte nutriente, a 45° C. A caracterização dos biossurfactantes parcialmente purificados foi feita por Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier e revelou bandas características de peptídeos e cadeias alifáticas, sugerindo que as moléculas podem ser tipos de lipoptídeos cíclicos. A produção máxima de BS foi alcançada com o melaço em concentrações de 5,0 e 7,0% (p/v). O BS de todos os isolados manteve suas propriedades tensoativas após a incubação a 80°C em uma ampla faixa de valores de pH (6,0 - 12,0) e de concentração salina (até 7% de NaCl, p/v) por nove dias. Testes de deslocamento de óleo em colunas de areia com petróleo bruto mostraram 25–33% de recuperação de óleo residual. Os biossurfactantes produzidos por esses isolados mostraram estabilidade sob condições extremas de temperatura e salinidade, o que é um indicativo promissor para futuras utilizações em MEOR.

Al-Bahry e colaboradores⁵² realizaram um estudo que destaca a utilização de melaço de tâmara para produção fermentativa de biossurfactantes. Quando o melaço foi utilizado como única fonte de carbono para a produção de BS usando *Bacillus subtilis* B20, obteve-se um rendimento de produto de $2,29 \pm 0,38$ g /L. O BS reduziu a tensão superficial de 60 para 25 mN/m e a tensão interfacial de 27 para 5,02 mN/m. Ele também mostrou estabilidade significativa sob uma ampla faixa de temperatura (40°C – 100°C durante uma hora e 121°C durante vinte minutos), pH (6,0 – 12,0) e concentrações de sal (até 4% de NaCl, mas mesmo em concentrações salinas superiores o BS retém quase que 60% de sua atividade superficial). O teste de deslocamento em meio poroso indicou uma recuperação adicional de 9,7% de óleo. Esse estudo mostrou que o melaço de tâmara pode ser adequado para a produção comercial de BS e este tem potencial para uso em processos de recuperação avançada de petróleo devido sua estabilidade em condições semelhantes a reservatório.

De Faria e colaboradores⁵³ investigaram a produção de fengicinas por *Bacillus subtilis* LSFM-05 em meio mineral contendo glicerol bruto como única fonte de carbono. O glicerol bruto é um subproduto da produção de biodiesel que, atualmente, tem valor baixo para os produtores de biodiesel. Uma opção para aumentar o valor agregado do glicerol bruto é usá-lo como matéria-prima para a produção microbiana. Os autores identificaram quatro variantes da fengicina A e três da fengicina B com componentes de ácidos graxos contendo 14 a 17 carbonos. Esses resultados demonstram que o glicerol bruto pode ser usado como matéria-prima para produzir fengicina em larga escala, especialmente em países que produzem grades quantidades de biodiesel (caso do Brasil).

2 OBJETIVOS

Considerando a importância das espécies bacterianas produtoras de biossurfactantes e a ampla gama de aplicabilidade deste, com foco nos processos de recuperação terciária de petróleo, o presente trabalho propôs como objetivos:

- a) A identificação e a caracterização fenotípica de uma linhagem bacteriana produtora de biossurfactante isolada a partir de cultivos tendo rocha de reservatório como inóculo
- b) A verificação das condições ótimas de cultivo da linhagem selecionada (meio de cultura, temperatura, salinidade, fonte de nitrogênio, fonte de carbono, fonte de carbono de baixo custo, relação C/N) para a produção de biossurfactante.
- c) Avaliar a estabilidade do biossurfactante produzido pela linhagem selecionada quanto aos parâmetros temperatura, salinidade e pH.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolamento da linhagem bacteriana estudada

A linhagem de estudo neste trabalho, denominada Ar70C2, foi obtida em uma etapa anterior do projeto, quando realizou-se o isolamento de bactérias produtoras de biosurfactantes a partir de cultivos inoculados com rocha de reservatório de petróleo recebidos do CENPES/PETROBRAS (Centro de Pesquisas Leopoldo Américo Miguez de Mello). No final de junho de 2013, nosso laboratório recebeu 12 frascos de cultivos aeróbios inoculados com porções de rocha triturada de reservatório de petróleo.

Estes cultivos foram denominados de cultivos-mãe e estavam acondicionados 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.

As amostras de rochas utilizadas como inóculos foram obtidas em agosto de 2012, durante a perfuração de um poço exploratório em um reservatório carbonático, no Campo de Aruanã (atualmente denominado de Tartaruga Verde), situado a cerca de 125 km da cidade de Macaé (RJ), no pós-sal da Bacia de Campos. As amostras foram provenientes de quatro perfis cilíndricos de rocha, de cerca de 20 centímetros cada, coletados cada um em uma profundidade diferente – 3.007, 3.035, 3.046 e 3.053m (considerando uma coluna d'água de 946m) -, com temperatura *in situ* de cerca de 80 °C e uma pressão de 4.560 psi.

Os cultivos com amostras de rocha de cada profundidade foram preparados em caldo LB (Luria-Bertani) modificado com três concentrações salinas diferentes: 35, 70 e 120 (g NaCl/L). O caldo LB, que tem em sua composição original (em g/L) triptona (10), extrato de levedura (5) e cloreto de sódio (5),⁵⁴ 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 e, em seguida, foi levado para esterilização em autoclave (1 atm, 121°C), por 20 minutos

A água do mar sintética foi composta de (em g/L): NaF (0,003), SrCl₂.6H₂O (0,02), H₃BO₃ (0,03), KBr (0,1), KCl (0,7), CaCl₂.2H₂O (1,113), Na₂SO₄ (4,0), MgCl₂.6H₂O (10,78), NaCl (23,5), Na₂SiO₃.9H₂O (0,02), Na₄EDTA (0,001), NaHCO₃ (0,2), com pH ajustado para 8,0 ± (0,5). Os cultivos com salinidade maior ou igual a 70 g/L foram suplementados com solução de elementos-traço, de composição (mg/L): H₃BO₃ (60), CoCl₂ (120), CuCl₂ (15),

MnCl₂ (100), ZnCl₂ (70), NiCl₂ (20), Na₂MoO₄ (25) e Na₂SeO₃ (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.

A partir dos cultivos-mães recebidos foi realizado o isolamento de bactérias aeróbias, feito em meio sólido de mesma composição, e os isolados resultantes deste processo foram avaliados com relação à capacidade de produção de biossurfactante (BS), por meio do teste de emulsificação E₂₄, utilizando como substrato o querosene.

Este teste (E₂₄ - índice de emulsificação após 24 horas), descrito por Cooper e Goldenberg⁵⁵ avalia a estabilidade e altura da camada de emulsão formada a partir do contato de dois líquidos com diferentes graus de polaridade, ou seja, um substrato hidrofóbico e a amostra em estudo. O preparo da amostra para o teste é descrito no item 3.4.1.1 adiante.

Das 39 linhagens inicialmente isoladas, 10 apresentaram capacidade emulsificante (E₂₄ igual ou maior que 10%), dentre as quais a linhagem Ar70C2 foi escolhida (no teste apresentou um E₂₄ de 42,8%). A denominação da linhagem selecionada – Ar70C2 - refere-se, respectivamente, à origem da rocha (campo de Aruanã), à salinidade do cultivo-mãe (70g/L NaCl), à profundidade da amostra rochosa (profundidade 'C', 3.046m) e ao número da colônia na placa de cultivo (2).

3.2 Identificação e caracterização da linhagem Ar70C2

A identificação da linhagem foi feita pelo Serviço de Identificação da empresa alemã DSMZ (*Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*), a partir da determinação da sequência completa do gene RNAr 16S, obtida pelo sequenciamento direto do rDNA 16S amplificado por PCR (*polymerase chain reaction*). A mesma empresa também realizou alguns testes bioquímicos para efeito de caracterização da linhagem, como a análise de ácidos graxos e testes bioquímicos específicos para identificação de espécies do gênero *Bacillus*, segundo padronização da empresa.

A seguir é feito um resumo do procedimento utilizado pela empresa para a identificação da linhagem. A extração do DNA genômico foi feita utilizando-se o MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnology Germany), seguindo-se as orientações do fabricante. A amplificação do rDNA 16S foi feita por PCR, e a purificação do produto da PCR foi realizada como descrito em Rainey e colaboradores.⁵⁶ Os produtos do PCR purificado foram sequenciados utilizando-se Kit de sequenciamento

BigDye® Terminator v1.1 (Applied Biosystems), conforme indicado no protocolo do fabricante. As reações de sequenciamento foram submetidas a eletroforese utilizando o Analisador Genético 3500xL da Applied Biosystems.

Os resultados do sequenciamento foram analisados utilizando-se o *software* MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis versão 7)⁵⁷ no servidor EzTaxon⁵⁸⁻⁶⁰ e no BlastN⁶¹ e foram comparados com sequências representativas de genes de rRNA 16S de organismos pertencentes ao filo *Firmicutes*. Para comparação, as sequências de rRNA 16S foram obtidas a partir da base de dados EMBL ou RDP.⁶²

Com os resultados do sequenciamento da linhagem uma árvore filogenética foi elaborada com o auxílio dos programas computacionais disponíveis no site Phylogeny (<http://www.phylogeny.fr>). O programa MUSCLE (v.3.8.31) foi utilizado para o alinhamento múltiplo e o Gblocks (v.0.91b), para refinar os alinhamentos. A filogenia foi realizada usando-se o método *Neighbor Joining* implementado pelo pacote PHYLIP (v3.696), e para o desenho da árvore foi utilizado o TreeDyn (v.198.3.) Na montagem da árvore foram consideradas a sequência completa do RNAr 16S da linhagem Ar70C2 e as sequências parciais do RNAr 16S das espécies com maiores percentuais de identidade com a referida linhagem, indicadas no resultado da identificação realizada pela DSMZ.

O kit *Analytical Profile Index* (API) foi utilizado para identificar o consumo de certos substratos durante o crescimento da linhagem em estudo. Este kit baseia-se no princípio de que durante o metabolismo vários substratos são consumidos, e como resultado há liberação de produtos e metabólitos que podem ser detectados por uma mudança na cor e na adição de reagentes específicos.

A análise de ésteres metílicos de ácidos graxos celulares (abreviado como FAME, do inglês *fatty acid methyl ester*) foi feita utilizando-se o Sherlock Microbial Identification System, de acordo com o método descrito no sítio eletrônico da empresa (<https://www.dsmz.de/services/services-microorganisms/identification/analysis-of-cellular-fatty-acids.html>) e reproduzido no Anexo A.

O teste de Gram e de coloração de endósporos foram feitos em nosso laboratório, segundo os procedimentos descritos a seguir.

3.2.1 Teste Gram

As bactérias gram-positiva e gram-negativa utilizadas para controle na coloração de Gram foram *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, respectivamente. Ambas foram cultivadas a

37 °C em caldo nutritivo, composto por NaCL (5 g/L), peptona (5 g/L), extrato de levedura (2 g/L) e extrato de carne (1 g/L) dissolvidos em água destilada, e pH ajustado para 7,4 ($\pm$ 0,2).

As lâminas foram preparadas com o cultivo em sua fase log de crescimento, sendo espalhado sobre a lâmina com o auxílio de uma alça de transferência. Esperou-se os esfregaços secarem e, em seguida, ocorreu a fixação pelo calor passando-se o lado inferior da lâmina sobre a chama do bico de Bunsen três vezes. Cobriu-se os esfregaços com uma solução de cristal violeta por 1 minuto⁶³, composta por uma mistura de duas soluções: solução A (2,0 g de cristal violeta, 100 mL de álcool etílico e 100 mL de álcool metílico) e solução B (4,0 g de oxalato de amônio em 400 mL de água destilada), sendo a solução final filtrada em filtro com poro de 0,45 μ m estéril após 24 horas de repouso. Lavou-se os esfregaços com água destilada e cobriu-se por mais 1 minuto com solução de lugol (agente mordente) composta por 4,5 g de iodeto de potássio, 3,0 g de iodo metálico e 450 mL de água destilada e diluiu-se uma parte desta solução em 20 partes de água destilada. Retirou-se o excesso de lugol e lavou-se as lâminas com etanol 95% para o processo de descolorização das células. As lâminas foram contra-coradas em seguida com uma solução aquosa 0,8 % de fucsina básica por 1 minuto e lavada novamente com água destilada. Observou-se as lâminas em microscopia de campo claro no microscópio Olympus - BX53 no aumento de 1.000x e utilizou-se o software CellSens Digital Imagem Standart para a captura de imagens.

3.2.2 Coloração de esporos

Preparou-se 30 mL de uma solução aquosa 5% do corante verde malaquita e uma solução estoque de safranina composta por 0,25 g de safranina em 10 mL de etanol 95%. Desta solução estoque, preparou-se uma solução de trabalho composta por 3 mL da solução estoque de safranina e 27 mL de água destilada (Nogueira e Miguel, 2013). As soluções foram filtradas em filtro com poro de 0,45 μ m estéril.

A bactéria controle utilizada foi o *Bacillus subtilis*, cultivada em meio caldo nutritivo a 37 °C, sendo o caldo nutritivo composto por NaCL (5 g/L), peptona (5 g/L), extrato de levedura (2 g/L) e extrato de carne (1 g/L) dissolvidos em água destilada, e pH ajustado para 7,4 ($\pm$ 0,2). O tempo de cultivo da bactéria em estudo e da bactéria controle foi de sete dias.

Preparou-se o esfregaço utilizando uma alça de transferência e espalhou-se o cultivo na lâmina, fixando-o pelo calor de uma chama. Cobriu-se o esfregaço com o corante verde

malaquita e, segurando a lâmina com uma pinça de madeira, aproximou-a da chama do bico de bunsen e esperou-se o corante aquecer até desprender vapor. Afastou-se a lâmina da chama e após 1 a 2 minutos, repetiu-se a operação por mais 3 vezes. Após esperar a lâmina esfriar para evitar choque térmico, lavou-se a lâmina suavemente com água destilada, e cobriu-se a lâmina com a solução de safranina por 30 segundos. Lavou-se a lâmina e após secar, observou-se em microscopia de campo claro no microscópio Olympus - BX53 no aumento de 1000x e utilizou-se o software CellSens Digital Image Standart para a captura de imagens.

3.3 Preparo das culturas de estoque e de trabalho da linhagem Ar70C2

As culturas-estoques da linhagem selecionada, preparadas com a finalidade de sua preservação para experimentos posteriores, foram preservadas por meio da criopreservação.

Alíquotas de 700µL de uma cultura na fase logarítmica crescida em caldo LB modificado foram colocadas em criotubos estéreis de 1,5 mL, seguido da adição de 300µL de uma solução estéril de glicerol a 50% (v/v). Os criotubos foram rapidamente mergulhados em nitrogênio líquido e, após o congelamento, foram mantidos em ultra-freezer a -80°C (adaptado de Brumano e colaboradores).⁶⁴

A cultura de trabalho foi preparada a partir da reativação de uma de cultura-estoque armazenado em ultra-freezer, conforme procedimento descrito a seguir.

Um criotubo contendo a cultura-estoque do isolado foi descongelado e seu conteúdo inoculado em um tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo LB modificado; este foi mantido em estufa bacteriológica a 55°C por 12 horas. Em seguida, uma alíquota de 1 mL desta cultura foi transferida para um tubo do tipo Eppendorf de volume 1,5 mL que foi levado à centrifugação por 15 minutos a 13.200 rpm. Após este processo, um volume de 1 mL do sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspenso em 0,5 mL do sobrenadante restante. O concentrado de células resultante foi então espalhado sobre uma placa contendo meio LB sólido modificado (adicionado de agarose a 2% como agente solidificante) com auxílio de uma alça de Drigalski e em seguida a placa foi mantida por 24 horas em estufa bacteriológica à temperatura de 55°C. Após este período a placa foi transferida para a geladeira, permanecendo em refrigeração para posterior utilização do isolado nos experimentos. Esta placa foi estocada em geladeira por aproximadamente 15 dias. Após este período uma nova cultura de trabalho era preparada a partir de um novo criotubo da cultura-estoque.

3.4 Ensaios de crescimento e de produção de biossurfactante pela linhagem Ar70C2

O planejamento experimental visou, principalmente, a determinação das condições ótimas de produção de biossurfactante pela linhagem Ar70C2 e envolveu as etapas mostradas no fluxograma da Figura 8. Os métodos analíticos utilizados para a avaliação das propriedades tensoativas do biossurfactante (índice de emulsificação, tensão superficial e tensão interfacial), para determinação de sua massa e para sua caracterização protéica e lipídica serão descritos logo a seguir, antes da descrição dos ensaios realizados.

Figura 8 - Fluxograma representando as etapas experimentais realizadas nesse trabalho. Na figura: E₂₄ representa o índice de emulsificação, DO a densidade óptica, TS a tensão superficial, Massa de BS é o rendimento total de BS obtido (em g/L de meio de cultura), C/N, onde C é Carbono e N é Nitrogênio.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.4.1 Métodos analíticos

3.4.1.1 Determinação do índice de emulsificação E₂₄

Como já mencionado no item 3.1, este teste tem como objetivo avaliar a estabilidade da camada de emulsão formada a partir da mistura de dois líquidos com diferentes graus de polaridade, portanto, imiscíveis.

Consiste em adicionar um volume de 2 mL de um cultivo de 7 dias, previamente separado das células por centrifugação na temperatura ambiente a 5.000 rpm por 15 minutos, em um tubo de ensaio (13x100 mm) já contendo o mesmo volume de querosene (ou qualquer outro substrato hidrofóbico). Esse tubo foi então submetido à agitação vigorosa (Vortex) por 2 minutos, após o qual permaneceu em repouso por 24 horas à temperatura ambiente. Após este período, o índice de emulsão foi calculado dividindo-se a altura da camada de emulsão pela altura total do volume líquido, multiplicado por 100 (Equação 1), resultando em uma medida que expressa a porcentagem emulsificada (Figura 9).

$$E_{24}(\%) = \frac{\text{Altura da Camada de Emulsão}}{\text{Altura total}} \cdot 100$$

Equação 1 – Equação para cálculo do índice de emulsificação.

Figura 9 – Foto mostrando a emulsão formada como resultado do teste do E₂₄.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.4.1.2 Extração e obtenção de massa bruta do biossurfactantes

A massa seca bruta de BS produzida foi estimada utilizando-se o método da precipitação ácida, descrito por Cooper e colaboradores.⁶⁵

O BS é isolado de uma cultura submetida à centrifugação à 25°C por 40 minutos à 10.000 rpm para a retirada da biomassa de células; o caldo livre de células tem seu pH ajustado para 2 através da adição de ácido clorídrico concentrado. Em seguida, o caldo acidificado é mantido em refrigeração em geladeira (4°C) *overnight*. Após esse período, a amostra é novamente centrifugada por 40 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante é descartado. O precipitado resultante é ressuspensionado em 20 mL de água destilada e é centrifugado a 15.000 rpm por 30 minutos; este processo é feito duas ou mais vezes para a remoção de sais ou outras impurezas que ainda podem estar presentes. Após esse processo, o precipitado é ressuspensionado em 20 mL de água destilada e seu pH é ajustado para 7 com NaOH 7,5 M. Em seguida é encaminhado para um concentrador a vácuo (SpeedVac™) para o processo de secagem, por 12 horas. O rendimento, em gramas por litro de meio de cultura, é calculado pesando-se o resultante desta secagem.

3.4.1.3 Determinação da Tensão Superficial (TS) e da Tensão Interfacial (TI)

As medidas de tensão superficial e interfacial foram realizadas segundo o método do anel de *Du Nouy*, descrito por Bodour e colaboradores⁶⁶, utilizando-se um aparelho denominado de tensiômetro automático de força (marca Attension, modelo Sigma).

Para as medidas de TS, pode-se utilizar 20 ml de uma solução de biossurfactante na concentração de 5ppm ou o mesmo volume do caldo livre de células dos cultivos em estudo; para ambos o seguinte procedimento é o mesmo: são colocados num copo de vidro limpo de 50 mL e, que em seguida, é levado para a plataforma do tensiômetro. O anel do fio de platina (do aparelho) é então submerso na solução (ou no caldo) e, em seguida, puxado lentamente através da interface líquido-ar, para medir a tensão superficial (mN/m). Entre cada medição, o anel de platina é lavado com acetona e hexano 60% e depois flambado em chama até o rubro.

Para as medidas de TI, um volume de 15 mL de uma solução contendo BS (na concentração de 5 ppm) foi colocada num copo de vidro limpo de 50 mL juntamente com 15 mL de hexadecano; o copo então foi colocado na plataforma do tensiômetro. Devido à diferença de densidade entre a água da solução e o hexadecano ocorre a formação de duas fases: a água com o BS ficam na fase inferior, enquanto que o hexadecano fica na fase

superior. O anel de fio de platina (do aparelho) é então submerso até a interface entre as duas soluções para a medida da tensão interfacial (mN/m). Como controle também foram realizadas medidas da tensão interfacial entre a água destilada e o hexadecano.

3.4.1.4 Quantificação de proteína total do biossurfactante

A análise do conteúdo de proteínas foi realizada usando-se o kit comercial Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific),⁶⁷ seguindo o protocolo do fabricante. O kit é composto por dois reagentes de trabalho (A e B) e seu padrão é apresentado com albumina bovina (2mg/mL). Este método combina a redução de íons Cu^{2+} para Cu^{+1} pela proteína em meio alcalino, com alta sensibilidade e detecção colorimétrica seletiva dos cátions de cobre usando ácido bicinóico. A reação de coloração, apresentada pela coloração roxa, ocorre pela quelação do ácido bicinóico com o íon de cobre disponível.

O reagente de trabalho foi preparado misturando-se as soluções A e B (50:1). Em uma microplaca de 96 poços, uma alíquota de 25 μL da amostra estudada (no caso, BS semi-purificado na concentração de 2mg/ml) ou do padrão albumina foi adicionada em cada um dos poços, seguida de 200 μL de reagente de trabalho. A placa foi agitada por 30 segundos e incubada por 30 minutos a 37 °C; em seguida, resfriada a temperatura ambiente e sua absorbância foi medida em 562 nm.

3.4.1.5 Determinação de ácidos graxos do biossurfactante

Esta análise foi realizada no laboratório do Grupo de Química Orgânica e Biocatálise do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP), pela Dra. Rafaely Nascimento Lima, que usou o protocolo descrito a seguir. Uma amostra de 5 mg do BS semi-purificado foi esterificada utilizando o método de esterificação de Fischer, sendo adicionado a um frasco de 5 mL, 1 mL de etanol, 1 mL de tolueno e 1 gota de ácido sulfúrico concentrado. A amostra foi mantida em aquecimento a 70 °C por 24 horas; após esse tempo ela foi submetida à extração líquido-líquido empregando 20 mL de acetato de etila e 10 mL de solução de NaHCO_3 a 10%, por 3 vezes. À fase orgânica adicionou-se sulfato de sódio anidro para retirada de água remanescente. O solvente orgânico foi então evaporado sob pressão reduzida, utilizando-se rota-evaporador, e o produto obtido foi submetido à análise pela técnica de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM⁶⁸). O produto da reação foi analisado em um cromatógrafo a gás GCEMQP2010 Ultra (Shimadzu Corporation, Japão), equipado com um amostrador de injeção automática AOC-20i (Shimadzu). A separação dos componentes da

amostra foi realizada em uma coluna capilar de sílica fundida (DB-5MS 5%-fenil-95%-dimetilpolisiloxano 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 mm de espessura de filme), em um fluxo constante de gás hélio 5,0 de 0,65 mL min⁻¹. A temperatura do injetor foi de 260 °C e 1,0 µL de amostra foi injetada com Split 10. O espectro de massas foi obtido pela ionização dos compostos por impacto de elétrons (70 eV) e análise dos fragmentos com m/z de 40 a 500 em aparelho quadrupolo. A temperatura da fonte de íons permaneceu em 260 °C e da interface a 300 °C. A programação de temperatura do forno iniciou-se a em 50 °C, com um aumento de 5 °C min⁻¹ até 300 °C, permanecendo por 5 min. O tempo total de análise foi de 55 min.

3.4.2 Teste de Salinidade

A quantidade de sal de um meio particular tem um efeito correspondente na produção de biossurfactante, uma vez que as atividades celulares dos microrganismos são afetadas pela concentração de sal.⁶⁹ Nesse sentido foram realizados experimentos com o objetivo de se encontrar uma salinidade ótima para o crescimento e produção de BS para o microrganismo em estudo.

Cultivos em caldo LB foram realizados, em duplicata, testando-se quatro salinidades totais de: 5, 25, 40 e 75 g/L de NaCl, onde 5g/L de NaCl vem da constituição do meio LB. Os cultivos para cada salinidade foram feitos em frasco tipo Schott Duran com 60 mL de caldo LB, a 55°C e sem agitação. Para as salinidades de 5 e 25 g/L de NaCl os meios foram preparados com água destilada, já os cultivos com 40 e 75 g/L de NaCl foram preparados com água do mar sintética, sendo que na composição deste último também foi adicionado solução de elementos-traço (composição descrita no item 3.1) na concentração de 5 mL/L. A utilização da água do mar sintética e da solução de elementos-traço nos meios com alta concentração salina foi sugerida pela equipe técnica da PETROBRAS S.A., como forma de garantir a disponibilidade de íons para manutenção do equilíbrio osmótico das células bacterianas nos meios de cultura. O controle do crescimento bacteriano foi realizado através de medidas de densidade óptica (DO) em espectrofotômetro U2800 da marca Hitachi a 600 nm em períodos de tempo de: 0, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas. Nesses mesmos intervalos de tempo a produção de BS foi avaliada pelo índice E₂₄, como descrito no item 3.4.1.1. Frascos contendo meio de cultura e incubados nas mesmas condições, sem os inóculos, foram utilizados como controle negativo para o crescimento e produção de

biossurfactante.

O pré-inóculo foi preparado adicionando-se uma alça padrão retirada a partir da cultura de trabalho em um frasco tipo Schott Duran contendo 30 mL de caldo LB com 70 g/L NaCl e mantido em estufa, a 55°C, por 12 horas. Na sequência, alíquotas de 3 mL (5% v/v de cada duplicata de cada salinidade) foram retiradas do frasco com o pré-inóculo e transferidas para cada uma das duplicatas de cada salinidade.

3.4.3 Teste do meio mineral em cultivos com e sem agitação.

O meio mineral (MM) descrito por Agarwal e Sharma⁶⁹ foi testado em ensaios prévios com a linhagem Ar70C2, resultando em bom crescimento com produção de biossurfactante e por essa razão foi escolhido para os testes de fontes de carbono e de nitrogênio. Antes, porém, era preciso avaliar se a condição de agitação favorecia a produção de biossurfactante, já que os testes prévios foram feitos sem agitação. Este meio tem como composição (g/L): Na₂HPO₄ (2,2), KH₂PO₄ (1,4), MgSO₄.7H₂O (0,6), FeSO₄.7H₂O (0,01), NaCl (70), CaCl₂ (0,02), extrato de levedura (0,02). O pH final do meio foi ajustado para 7,0±(0,2) e para esse teste inicial não foi utilizado o extrato de levedura. O ensaio ocorreu nas condições estático e em agitação de 100 rpm.

A fonte de carbono utilizada foi glicose, na concentração de 8 g/L, e a fonte de nitrogênio foi nitrato de sódio na concentração de 1g/L. A salinidade utilizada foi de 35 g/L de NaCl.

O teste foi realizado em duplicata, tanto para a condição estática como para a condição de agitação a 100 rpm. As duplicatas foram feitas em frascos do tipo Schott Duran de 500 mL, com o volume final de 250 mL de cultivo.

Os pré-inóculos foram preparados como segue. O pré-inóculo 1 foi feito retirando-se uma alça padrão de crescimento da linhagem Ar70C2 em meio sólido (cultura de trabalho) e inoculando-se em um tubo de ensaio com 5 mL LB modificado com a salinidade de 35 g/L de NaCl, em seguida foi mantido *overnight* em estufa bacteriológica a 55°C.

O pré-inóculo 2 foi feito a partir de 1 mL do pré-inóculo 1, que foi adicionado em um tubo de ensaio contendo 4 mL de meio LB modificado. Foram preparados dois pré-inóculos 2, já que cada um foi inoculado em uma duplicata diferente. Os dois tubos de ensaio foram mantidos por 12 horas em agitação de 100 rpm a 55°C e depois foram inoculados cada um em uma duplicata contendo o MM, na concentração final de 10% (v/v).

O acompanhamento dos cultivos foi feito durante oito dias, com medidas periódicas de índice de emulsificação E_{24} , como descrito no item 3.4.1.1.

3.4.4 Teste de fontes de Carbono (C)

Uma vez que a salinidade e o meio mineral que resultaram em uma melhor produção de BS foram determinados, a próxima etapa foi selecionar uma fonte de carbono que contribuísse para a maior produção de BS. A qualidade e a quantidade da produção de biossurfactantes são afetadas e influenciadas pela natureza do substrato de carbono.⁶⁹

Deste modo, cultivos em meio mineral (MM) utilizando alternadamente diferentes fontes de carbono, dentre as quais fontes de baixo custo, foram realizados para determinar qual(is) fonte(s) resultaria(m) em uma melhor produção de BS. As fontes de carbono testadas foram: melaço, glicose, soro de leite de búfala, óleo de cozinha (soja) usado, glicerina vegetal e sacarose. O melaço foi obtido da Usina São Martinho (localizada em Pradópolis – SP). A glicose utilizada era da marca Sigma (D-(+)-Glucose). O soro de leite de búfala utilizado foi um resíduo proveniente da produção de queijo muçarela da marca Brava, produzido pela Agropecuária Indústria e Comércio Búfalo Brasil LTDA. O óleo de cozinha usado nos foi cedido pelo bar da EESC (bar da Escola de Engenharia de São Carlos), e foi proveniente da fritura de salgados com óleo de soja de várias marcas. A glicerina vegetal era da marca Synth, mas produzida pela Buckmister (glicerina bidestilada vegetal) que é derivada da soja. A sacarose era da marca USB.

Os ensaios foram realizados em etapas, testando-se duas fontes de carbono por vez. A relação carbono/nitrogênio (C/N) foi fixada em 8, como nos ensaios anteriores.

Ao MM (Agarwal e Sharma⁵⁵) adicionou-se NaNO_3 (1g/L) como fonte de nitrogênio e ajustou-se a salinidade para 35g/L NaCl. Os cultivos foram preparados em duplicatas em frasco tipo Schott Duran, contendo 180 ml de MM e 20 ml de inóculo (10% v/v).

Os pré-inóculos foram preparados como já descrito no item 3.4.3.

Os ensaios foram feitos nas condições estático e em agitação de 100 rpm, com e sem extrato de levedura (0,02 g/L). Todos os frascos foram incubados a 55°C, em estufa ou em mesa incubadora rotativa.

Para cada fonte de carbono, em cada condição testada, foi feito frasco contendo meio de cultura nas mesmas condições, sem o inóculo, para ser utilizado como controle negativo para o crescimento e para o teste de produção de biossurfactante.

Os frascos foram incubados por 7 dias e alíquotas foram retiradas ao longo deste período para medida de densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro U2800 da marca Hitachi e para realização de testes de emulsificação (E_{24} , descrito em 3.4.1.1).

3.4.5 Teste de Temperatura

A linhagem Ar70C2 foi isolada originalmente de um cultivo aeróbio incubado a 55°C, temperatura esta que foi mantida em todos os ensaios feitos até então. Entretanto, considerando que temperatura informada do reservatório de origem da linhagem era cerca de 80°C, testamos cultivos em outras temperaturas para avaliar seu comportamento de crescimento e produção de biossurfactante com relação a este parâmetro.

Este ensaio foi realizado em três etapas, como mostrado na Figura 10 .

Figura 10 - Fluxograma que resume as etapas realizadas no teste para avaliar o crescimento e a produção de BS em diferentes de temperaturas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Primeiramente foram testadas as temperaturas de 37, 45, 55 e 65°C. Os cultivos foram realizados em 50 mL de caldo LB modificado, com salinidade de 35 g/L de NaCl e sem agitação (parâmetros definidos em etapas anteriores), em triplicata para cada temperatura testada.

Os pré-inóculos foram preparados como já descrito no item 3.4.3.

Frascos contendo meio de cultura incubados nas mesmas condições de cada temperatura, sem os inóculos, foram utilizados como controle negativo para o crescimento e produção de biossurfactante.

Alíquotas de 1 mL de cada triplicata foram coletadas nos tempos 0, 6, 24 e 48 horas para a medida de densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro U2800 da marca Hitachi.

Baseado nos resultados deste teste com relação ao crescimento e produção de BS, uma segunda etapa deste experimento foi realizada, desta vez, testando-se as temperaturas de 55, 65 e 70°C, e realizando-se a determinação da massa seca de BS produzida em cada temperatura.

As triplicatas de cada temperatura foram feitas com volume de 100 mL de meio LB modificado cada uma, com concentração de 35g/L NaCl, que foram mantidas em estufas nas temperaturas em estudo.

Alíquotas de 2 mL de cada triplicata foram coletadas nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas para a medida de densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro U2800 da marca Hitachi e também para a medida de índice de emulsificação E_{24} (descrito 3.4.1.1).

Os frascos contendo meio de cultura nas mesmas condições foram feitos, sem os inóculos, para serem utilizados como controle negativo para o crescimento e E_{24} .

A determinação da massa seca de BS bruto produzido foi realizada para cada condição. Para tal, foram preparados 2 litros de meio LB modificado com salinidade de 35 g/L de NaCl divididos em dois frascos de vidro do tipo Schott-Duran com volume total de 2 litros. Aos frascos foram adicionados inóculos, conforme preparo explicado no item 3.4.3. Ambos os frascos foram mantidos por sete dias em estufas bacteriológicas, um a 65° e outro a 70°C. A determinação da massa seca de BS bruto a partir do cultivo incubado a 55°C foi feita em momento anterior, porém seguindo-se os mesmos passos.

O rendimento de BS produzido foi estimada utilizando-se o método da precipitação ácida, conforme descrito no item 3.4.1.2. Em particular, nesse experimento, as culturas permaneceram por sete dias em estufas bacteriológicas de temperaturas de 65 e 70°C e, somente depois deste período de tempo, o processo de precipitação ácida foi realizado.

Na terceira etapa do teste, as temperaturas de 55 e 65°C foram selecionadas para ensaios de crescimento e produção de BS, agora incubados por um tempo maior que o acompanhado na etapa anterior, com medidas de tensão superficial do extrato livre de células. Uma nova determinação de massa seca do BS também foi feita nesta etapa.

As triplicatas foram feitas para ambas as temperaturas, em frascos do tipo Schott-Duran com volume de 500 ml, contendo 300 ml de LB modificado com a salinidade de 35 g/L de NaCl. Estes foram inoculados como descrito no item 3.4.3 e, em seguida, foram mantidas em estufas bacteriológicas nas respectivas temperaturas durante 6 dias, onde, neste período, foram realizadas medidas de densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro U2800 da marca Hitachi nos intervalos de tempo de 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas e também medidas de E_{24} . Para servir como controle, foram preparados frascos contendo LB modificado na salinidade 35 g/L que foram mantidos, sem inóculo, nas temperaturas testadas durante todo o período do experimento.

Medidas de tensão superficial (TS) foram feitas a partir de alíquotas retiradas dos cultivos, nos intervalos de tempo de 48, 96 e 144 horas. Alíquotas de 20 ml de cada cultura foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 30 minutos para a retirada da biomassa celular. O extrato livre de células foi utilizado para a determinação da TS, conforme método descrito no item 3.4.1.3.

Nesta etapa ainda foram preparados, com o mesmo inóculo inicial dos cultivos, dois volumes de 1L de caldo LB modificado (salinidade de 35 g/L de NaCl) acondicionados cada um em um frasco de vidro do tipo Schott-Duran com volume total de 2 litros. Um frasco foi mantido em estufa bacteriológica à 55°C e o outro à 65°C, durante 7 dias. Após este período, os cultivos passaram pelo processo de precipitação ácida para a medida da massa seca bruta de BS produzido (conforme procedimento descrito no item 3.4.1.2).

3.4.6 Influência da solução de elementos-traço

Os elementos-traço ou micronutrientes correspondem aos metais, e embora sejam necessários em baixas concentrações, são essenciais às funções celulares, assim como os macronutrientes, pois muitos deles desempenham papel estrutural em várias enzimas.^{70,71}

Este teste foi realizado com o objetivo de se testar a influência exercida pela solução de elementos-traço (cuja composição já foi descrita no item 3.1) no crescimento da linhagem Ar70C2 e sobre sua produção de BS.

Os ensaios foram realizados em triplicatas preparadas em frascos do tipo Schott-Duran com volume total de 500 ml, contendo 300 ml de MM na salinidade de 35 g/L de NaCl. A fonte de nitrogênio utilizada foi o NaNO_3 (na concentração de 1g/L) e fonte de carbono a glicerina vegetal (na concentração de 8 g/L).

Duas triplicatas foram feitas, uma contendo solução de elementos-traço na concentração de 5 ml/L e outra sem a presença desta. Os cultivos foram preparados conforme descrito em 3.4.3 e mantidos em estufa bacteriológica à 55°C por 72 horas, com retiradas periódicas de alíquotas para medidas de E_{24} (como descrito no item 3.4.1.1) e de densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro U2800 da marca Hitachi. Ainda, no tempo 72 horas foram realizadas medidas de tensão superficial, conforme descrito no item 3.4.1.3.

Para ambas as condições testadas foram feitos frascos contendo meio de cultura nas mesmas condições, sem o inóculo, para serem utilizados como controle negativo para o crescimento, índice de emulsificação e tensão superficial.

3.4.7 Teste das fontes de Nitrogênio (N)

A fonte de nitrogênio é um dos mais importantes fatores para a produção de biossurfactantes por microrganismos. Baixos níveis de nitrogênio limitam o crescimento bacteriano, favorecendo o metabolismo celular para a produção de metabólitos. Em contraste, o excesso de nitrogênio leva à síntese de material celular e limita o acúmulo de produtos.⁷²

O teste para selecionar a fonte de nitrogênio que otimiza a produção de BS e o crescimento do microrganismo foi realizado em duas etapas, como indicado na Figura 11.

Figura 11 - Resumos dos testes para seleção da fonte de nitrogênio.
Fonte: Elaborada pela autora.

Na primeira etapa, três fontes de nitrogênio foram testadas - NaNO₃, NH₄Cl e NH₄NO₃ – em cultivos separados com três diferentes fontes de carbono. Neste caso, as fontes de carbono escolhidas (glicerina vegetal, melaço e glicose) foram as que geraram melhores resultados em termos de crescimento e produção de BS no teste das fontes de carbono feito previamente. Os experimentos foram feitos em triplicatas para cada fonte de nitrogênio a ser testada. Os cultivos foram feitos em frascos do tipo Schott-Duran com volume total de 500 ml, contendo 300 ml de MM na salinidade de 35 g/L de NaCl, com adição da solução de elementos-traço na concentração de 5ml/L, e mantendo-se o C/N igual a 8. Um resumo dos procedimentos experimentais é mostrado na Figura 12.

Figura 12 - Cultivos realizados com as fontes de nitrogênio testadas, utilizando fontes de carbono selecionadas em teste anterior.

Fonte: Elaborada pela autora.

O inóculo de cada triplicata foi feito como já mencionado no item 3.4.3, em meio LB

modificado com salinidade de 35 g/L.

Depois de inoculados, os frascos foram mantidos em estufa bacteriológica na temperatura de 55°C durante 6 dias, e durante este período foram realizadas medidas de densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro U2800 da marca Hitachi e medição do índice E_{24} , nos intervalos de tempo de 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. No sexto dia também foram realizadas medidas de tensão superficial (TS), como descrito no item 3.4.1.3.

Frascos contendo meio de cultura nas mesmas condições, sem o inóculo, foram preparados como controle negativo para o crescimento, medição de E_{24} e de TS.

Análise estatística comparativa entre as condições testadas foi realizada, tomando-se como fator de comparação o índice E_{24} , conforme descrito no item 3.7.

A segunda etapa dos testes envolveu a quantificação de BS (em massa seca), para auxílio na escolha da melhor condição testada na primeira etapa (combinação de fontes de carbono e nitrogênio).

Os ensaios foram feitos da seguinte maneira: a primeira precipitação envolveu a fonte de nitrogênio NaNO_3 , na concentração de 1g/L. Foram preparadas três culturas em frascos de vidro do tipo Schott-Duran com volume total de 2 litros, com volume total de 1L de MM à 35 g/L de NaCl, com adição da solução de elementos-traço (na concentração de 5 mL/L). Essas culturas tinham uma fonte de carbono diferente cada uma - melaço, glicerina vegetal e glicose - na concentração de 8 g/L. Essas culturas foram inoculadas conforme descrito no item 3.4.3. Este mesmo procedimento foi repetido para as fontes de nitrogênio NH_4Cl e NH_4NO_3 .

A quantificação de BS foi feita por precipitação ácida, conforme descrito no item 3.4.1.2, com a diferença de que as culturas foram deixadas em estufas bacteriológicas à 55°C por 96 horas. O tempo de incubação foi determinado a partir dos resultados da análise estatística feita na etapa anterior.

3.4.8 Otimização da relação C/N

A fonte e a concentração de nitrogênio, bem como a relação C/N são relatados por exercerem um efeito importante na síntese de biossurfactantes.⁷³

Os testes para a otimização da relação C/N foram realizados utilizando-se as fontes de carbono e de nitrogênio selecionadas a partir dos testes descritos nos itens 3.4.4 e 3.4.7, respectivamente.

A primeira etapa da otimização foi realizada com a finalidade de se investigar o

comportamento da produção de BS para algumas relações C/N. Os ensaios realizados nesta etapa foram planejados segundo o modelo de superfície de resposta, utilizando-se o design de composto central (CCD) do tipo face centrada.

Um experimento central composto é o experimento de superfície de resposta mais comumente utilizado. Experimentos centrais compostos são experimentos fatoriais completos ou fracionados com pontos centrais, ampliados com um grupo de pontos axiais (também chamados pontos estrela) que permitem estimar curvas para otimização de processos.⁷⁴ É considerado uma potente e eficiente ferramenta matemática que pode ser aplicada em otimizações de processos fermentativos, seleção da composição de meios para a produção de enzimas,⁷⁵⁻⁷⁷ produção de outros metabólitos,⁷⁸⁻⁸¹ produção de esporos e otimização da produção de biomassa.⁸²

O desenho do método experimental (

Tabela 3) foi feito utilizando-se o design composto central de face centrada (CCD) do *software* Minitab 18[®]. Dois fatores independentes, as concentrações da fonte de carbono selecionada (2, 4 e 8 g/L) e da fonte de nitrogênio selecionada (0,5, 1 e 2 g/L) foram examinados, o que, conseqüentemente, resultariam nas seguintes relações C/N: 1, 2, 4, 8 e 16. As respostas analisadas foram o índice de emulsificação e a massa seca de BS produzido. O experimento desenhado pelo *software* Minitab 18[®] resultou em 14 corridas, onde dessas, 6 corridas são de ponto central, para avaliar a magnitude do erro experimental.

Tabela 3 - Delineamento experimental pelo método de composto central de face centrada (CCD). A tabela consiste dos dados gerados pelo programa Minitab® 18 para a otimização das concentrações das fontes de carbono (C) e de nitrogênio (N).

Experimento Central Composto				Fatorial com dois níveis: Fatorial completo		
Resumo do Experimento				Tipos de Ponto		
Fatores: 2		Réplicas: 1		Pontos do cubo: 4		
Ensaio base: 14		Total de Ensaios: 14		Pontos centrais no cubo: 3		
Blocos Base: 2		Total De Blocos: 2		Pontos Axiais: 4		
$\alpha = 1$				Pontos centrais em axial: 3		
StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	Concentração da fonte de C (g/L)	Concentração da fonte de N (g/L)	C/N
5	1	0	1	4	1	4
4	2	1	1	8	2	4
3	3	1	1	2	2	1
6	4	0	1	4	1	4
2	5	1	1	8	0,5	16
7	6	0	1	4	1	4
1	7	1	1	2	0,5	4
9	8	-1	2	8	1	8
11	9	-1	2	4	2	2
14	10	0	2	4	1	4
8	11	-1	2	2	1	2
10	12	-1	2	4	0,5	8
13	13	0	2	1	4	4
12	14	0	2	1	4	4

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a realização deste experimento os cultivos foram preparados em frascos do tipo Schott-Duran de volume de 500 ml, com o volume final de 300 ml de MM na salinidade de 35 g/L de NaCl, com adição de solução de elementos-traço (5ml/L), e mantidos em estufa bacteriológica à 55°C durante 96 horas. Após esse período, a avaliação da produção de BS foi feita através da medida do E₂₄ (conforme o item 3.4.1.1) e através da quantificação da massa produzida após precipitação ácida e secagem (como descrito no item 3.4.1.2). Para cada condição testada foram feitos frascos contendo meio de cultura nas mesmas condições, sem o inóculo, para serem utilizados como controle negativo. Os inóculos de cada frasco foram feitos conforme o item 3.4.3.

A segunda etapa da otimização foi realizada com a finalidade de se refinar o resultado da etapa anterior, visto que ocorreram problemas no ajuste do modelo de CCD com os resultados obtidos. Nesta segunda etapa, os cultivos da etapa anterior que apresentaram maiores valores de E₂₄ foram escolhidos com o objetivo de se selecionar, dentre eles, a relação C/N que mais

favoreceu a produção de BS. As condições de C/N testadas nesta etapa estão resumidas na Tabela 4.

Tabela 4 - Resumo das concentrações das fontes de carbono e de nitrogênio testadas na segunda etapa da otimização da relação C/N. A, B e C correspondem às denominações das réplicas

Frascos	Concentração de glicerina vegetal (g/L)	Concentração de NaNO₃ (g/L)	Relação C/N
F1 (A, B e C)	2	0,5	4
F2 (A, B e C)	4	0,5	8
F3 (A, B e C)	2	1	4
F4 (A, B e C)	4	1	4

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a realização do experimento desta segunda etapa foram preparados cultivos em frascos do tipo Schott-Duran de volume de 500 ml, com o volume final de 300 ml de MM na salinidade de 35 g/L de NaCl, com adição de solução de elementos-traço (5ml/L). Cada condição de relação C/N testada foi preparada em triplicata (frascos A, B e C, como mostrado na Tabela 4). O preparo dos inóculos de cada frasco foi feito conforme o item 3.4.3.

As culturas foram mantidas em estufa bacteriológica à 55°C durante 96 horas. Após esse período, foi feita uma avaliação da produção de BS, por meio de medidas de E₂₄ (conforme o item 3.4.1.1) e da quantificação da massa produzida após precipitação ácida e secagem (como descrito no item 3.4.1.2). Neste tempo, também foram realizadas medidas de tensão superficial de cada cultivo, a partir do caldo livre de células, como descrito no item 3.4.1.3.

Para cada condição testada foram preparados frascos contendo meio de cultura nas mesmas condições, sem o inóculo, para serem utilizados como controle negativo.

3.5 Avaliação da capacidade emulsificante em diferentes substratos orgânicos

Com o intuito de se investigar a atividade do BS perante diferentes graus de hidrofobicidade, foi realizado um teste de emulsificação (E₂₄) utilizando-se vários substratos hidrofóbicos. A capacidade de um agente emulsificante emulsionar vários substratos hidrofóbicos pode ser explorada na limpeza de tanques de óleo, no transporte de óleo e combustíveis pela formação de emulsões e em processos de MEOR.¹³ Os substratos testados foram: querosene, óleo de motor (10W40), óleo de oliva (marca Andorinha), óleo mineral, óleo vegetal (girassol), tolueno, hexano, iso-octano, acetato de etila, butanol, clorofórmio, diclorometano e dicloroetano.

Para tal teste foi preparada uma cultura em frasco do tipo Schott-Duran de volume de 500 ml, com o volume final de 300 ml de MM na salinidade de 35 g/L de NaCl, com adição de solução de elementos-traço (5ml/L). A fonte de C utilizada foi glicerina vegetal (na concentração de 2 g/L) e a fonte de N o NaNO_3 (na concentração de 0,5 g/L). Os inóculos de cada frasco foram feitos conforme o item 3.4.3. A cultura foi mantida em estufa bacteriológica à 55°C durante 96 horas. Após esse período, foram realizadas medidas de E_{24} (conforme o item 3.4.1.1) nos substratos selecionados. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. Foram realizadas as mesmas medidas, com estes mesmos substratos, com meio de cultura sem inóculo, com a finalidade de servirem como controle negativo.

3.6 Testes de estabilidade do biossurfactante

A eficiência dos biossurfactantes é uma função de suas condições ambientais; e o pH, a salinidade e a temperatura têm um papel significativo neste sentido.⁸³

O BS semi-purificado (obtido a partir da precipitação ácida, como descrito no item 3.4.1.2) foi testado quanto a sua estabilidade frente a variações de pH, temperatura e salinidade.

Para o estudo da estabilidade frente a variações de pH, um volume de 50 mL de uma solução 0,1% (p/v) do BS 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.

Para o estudo da estabilidade térmica, alíquotas de 10 mL de uma solução 0,1% (p/v) do BS semi-purificado dispostas em frascos de vidro do tipo penicilina, com volume total de 30 mL, foram mantidas nas temperaturas -18°C (em congelador); 4°C (em refrigerador); 25°C, 40°C, 55°C, 80°C 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 a verificação do efeito da força iônica, amostras de 10 mL de uma solução 0,1% (p/v) do BS semi-purificado foram transferidas para tubos do tipo falcon, de volume total de 50 mL, e tiveram sua salinidade ajustada para 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21% (p/v), com a adição de NaCl.

Após cada condição ter sido atingida, as amostras foram avaliadas quanto à capacidade de emulsão, por meio do teste E_{24} (conforme o item 3.4.1.1).

3.7 Análise Estatística

A escolha das condições ótimas de produção de BS quanto aos seguintes fatores testados - salinidade, fonte de carbono (C), fonte de nitrogênio (N) e relação C/N – foi feita após análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios. Primeiro os dados foram tratados por análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5%. Juntamente com a ANOVA realizou-se o teste de comparações de médias de Tukey, aplicado para a verificação de equivalência ou diferença das médias dos dados obtidos. A análise foi feita utilizando-se o *software* Minitab® 18.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação e caracterização da linhagem Ar70C2

O resultado da identificação da linhagem Ar70C2 feita por meio da técnica do sequenciamento do gene RNAr 16S está apresentado na Tabela 13. Os maiores percentuais de identidade do isolado ocorreram com as espécies *Bacillus alveayuensis* (99,9%), *Bacillus aeolius* (97,3%) e *Bacillus methanolicus* (96,7%)

	% 16S rRNA gene sequence similarity to ID 17-354
<i>Bacillus alveayuensis</i> TM1 ¹ (AY605232)	99,9
<i>Bacillus paralicheniformis</i> KJ-16 ¹ (LBMN01000156)	95,8
<i>Bacillus aeolius</i> 4-1 ¹ (AJ504797)	97,3
<i>Bacillus wuyishanensis</i> FJAT-17212 ¹ (KF040589)	96,0
<i>Aeribacillus pallidus</i> DSM3670 ¹ (Z26930)	96,6
<i>Bacillus methanolicus</i> PB1 ¹ (AFEU01000002)	96,7
<i>Bacillus panacisoli</i> CJ32 ¹ (JQ806742)	95,6
<i>Bacillus pakistanensis</i> NCCP-168 ¹ (AB618147)	96,4
<i>Bacillus crescens</i> JC247 ¹ (LN625239)	96,1
<i>Bacillus fengquensis</i> NPK15 ¹ (KC291653)	96,0
<i>Bacillus songklensis</i> CAU1033 ¹ (JN036548)	96,1

Figura 13 - Porcentagem de identidade da sequência completa do gene RNAr16S da linhagem Ar70C2 com a de outros microrganismos (das bases de dados EMBL ou RDP).

Fonte: Elaborada pela autora

Estas espécies similares foram isoladas de ambientes diversos: *Bacillus alveayuensis*, bactéria termofílica isolada de sedimentos marinhos profundos⁸⁴; *Bacillus aeolius*, uma bactéria termofílica, halofílica e aeróbica isolada a partir de água de uma fonte termal do mar raso na ilha de Vulcano (Itália),⁸⁵ *Bacillus methanolicus*, bactéria termofílica, aeróbica, isolada de lodo de reator de tratamento de resíduos.⁸⁶⁻⁸⁷

O resultado da construção da árvore filogenética está representado na figura 14. Esta foi elaborada usando-se o método de *Neighbor-Joining* (NJ). O algoritmo NJ^{88,89} é extremamente popular, rápido e apresenta boa performance quando a divergência entre as sequências é baixa. Esse algoritmo é baseado em uma matriz de distância que faz uso de modelos probabilísticos de evolução.⁹⁰ Na figura 14, os números em vermelho são os valores de *bootstrap* em mil réplicas. A interpretação exata do limite aceitável da proporção de *bootstrap* é abstrata; quanto maior a proporção é fácil interpretar que é maior a confiança na topologia daquele nó. Alguns trabalhos^{91,92} concluíram que um ponto de corte razoável seria de 70%.

A nível de classificação, umas das abordagens mais eficazes para se fazer a taxonomia de *Bacillus* pode ser a análise de sequenciamento de moléculas de RNAr 16S. Em um levantamento de sequenciamento RNAr 16S mais recente, três principais grupos taxonômicos de *Bacillus* foram definidos - clusters I, II e III.⁹³

Se considerarmos o artigo de descrição⁸⁴ da espécie *B. alveayuensis*, a árvore filogenética construída pelo método NJ utilizando sequências parciais do gene RNAr 16S mostra as relações entre as linhagens TM1^T e TM5 e alguns táxons intimamente relacionados da família Bacillaceae, entre eles o *Geobacillus stearothermophilus*.

Análises comparativas de RNAr 16S de linhagens de *Bacillus* termófilas e psicrófilas mostraram que os termófilos *B. stearothermophilus*, *B. thermodenitrificans* e *B. caldotenax* formaram um subgrupo dentro do cluster do *B. subtilis*, mas separado dos mesófilos “termotolerantes” *B. subtilis* e linhagens de *B. licheniformis* e do termófilo moderado *B. coagulans*.⁹³

Considerando a proximidade genética das duas linhagens de *B. alveayuensis* com o *Geobacillus stearothermophilus* e que este último está classificado como pertencente ao cluster I do *B. subtilis* pode-se afirmar que é possível que a Ar70C2 (que, como mostrado na figura 14, está intimamente relacionando com o *B. alveayuensis* TM1) seja enquadrado também neste mesmo cluster.

Figura 14 - Árvore filogenética construída com sequências de rRNA16S total da Ar70C2 e sequências parciais dos outros microrganismos. Pode-se notar a forte relação entre as linhagens Ar70C2 e o *B. alveayuensis* TM1 e algumas outras próximas do gênero *Bacillus*.

Fonte: Elaborada pela autora

Os resultados de testes bioquímicos realizados pela empresa DSMZ (*Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*) com a linhagem Ar70C2 são apresentados na Tabela 5 e na Tabela 6. Nestas tem-se os resultados dos testes

fenotípicos, revelando algumas características da linhagem; e o resultado do teste API® 50 CH⁹⁴, respectivamente.

Segundo a descrições das linhagens TM1^T e TM5 de *B. alveayuensis* ambas apresentam as características presentes na

Tabela 7.⁸⁴ Nesta também foi adicionada uma coluna para a linhagem Ar70C2 e em vermelho estão marcadas as características cujos resultados foram iguais entre as linhagens TM1^T e Ar70C2. A comparação é realizada com a TM1^T pois a porcentagem de identificação, obtida a partir do sequenciamento do RNAr 16S, dessa linhagem com a Ar70C2 é de 99,9%.

Tabela 5 - Resultados apresentados pela linhagem Ar70C2 aos testes bioquímicos realizados pela empresa DSMZ. Símbolos: + reação positiva; – reação negativa; w: positivo fraco.

Testes Fenotípicos	
Propriedades	Ar70C2
Oxidase	+
Catalase	+
Crescimento Anaeróbico	-
Reação Voges-Proskauer	-
pH no meio Voges-Proskauer	5.7
Caldo de lisozima	-
Uso de	
Citrato	+
Propionato	+
Succinato	+
Fumarato	+
Acetato	+
L-Malato	+
Gás a partir da glicose	-

Hidrólise de	
Caseína	-
Gelatina	w
Amido	+
Tween 80	-
Esculina	+
Reação Indol	-
Fenilalanina desaminase	-
Arginina dihidrolase	+
Lectinase	-
NO ₂ de NO ₃	-
Tirosina	-
Urease	+
Motilidade	-
Hemólise	+
Produção de H ₂ S	+

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 6 - Resultados apresentados pela linhagem Ar70C2 no teste API® 50 CH (*Analytical Profile Index*, testes de fermentação de diferentes carboidratos). Símbolos: + reação positiva, - reação negativa, w positivo fraco, ? positivo questionável.

API 50	Ar70C2
Glicerol	w
Eritritol	-
D-Arabinose	-
L-Arabinose	-
Ribose	w
D-Xilose	-
L-Xilose	-
Adonitol	-
β -Me-D-xilosídeo	-
Galactose	-
Glicose	w
Frutose	w
Manose	w
Sorbose	-
Ramnose	-
Dulcitol	-
Inositol	-
Manitol	-
Sorbitol	-
α -Metil-D-Manosídeo	-

API 50	Ar70C2
α -Metil-D-Glicosídeo	-
N-Acetil-Glicosamina	+
Amidalina	-
Arbutina	-
Esculina	-
Salicilina	-
Celobiose	-
Maltose	?
Lactose	-
Melibiose	-
Sacarose	w
Trealose	w
Inulina	-
Melezitose	-
Rafinose	-
Amido	-
Glicogênio	-
Xilitol	-
Gentiobiose	-
D-Turanose	-
D-Lixose	-
D-Tagatose	-
D-Fucose	-
L-Fucose	-
D-Arabitól	-
L-Arabitól	-
Gluconato	-
2-Cetogluconato	-
5-Cetogluconato	-

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 7 – Características de três linhagens identificadas como *B. alveyuensis*.

Propriedades	TM 1 ^T	TM 5	Ar70 C2
Catalase	+	+	+
Oxidase	-	-	+
Hidrolise de:			
Esculina	+	+	+
Caseína	+	+	-
Amido	-	-	+
Butirina	-	-	
Utilização de citrato	-	-	+
Crescimento anaeróbico	-	-	-
Produção de ácido a partir de:			

D-Fructose	+	+	w
D-Galactose	-	-	-
D-Manose	+	+	w
D-Ribose	-	-	w
D-Trehalose	+	+	w
D-Xilose	-	-	-
Celobiose	-	-	-
Maltose	+	+	?
Ramnose	-	-	-
Rafinose	-	-	-
Sacarose	+	+	w
Glicogênio	-	-	-
Glicerol	+	w	w
Manitol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
5 - Cetogluconato	+	+	-

Fonte: Elaborada pela autora.

Pela análise das tabelas (5, 6 e 7) nota-se que muitas das características são discrepantes, principalmente em relação ao teste API50. Este mostrou uma reação positiva somente para a N-acetil-glicosamina e uma reação fraca a glicose.

Neste teste, os microrganismos são colocados para crescer no meio API50, cuja composição é (em g/L): polipeptona (10 g origem bovina / porcina), extrato de levedura (5 g), tween 80 (1 ml), fosfato dipotássico (2 g), acetato de sódio (5 g), citrato de amônio dibásico (2 g), sulfato de magnésio (0,20 g), sulfato de manganês (0,05), bromocresol púrpura (0,17 g), pH 6,7-7,1. Pode-se notar que é um meio com baixa salinidade. Há também o fato de que teste é realizado, geralmente, na temperatura de 30 ou 37°C.⁹⁵ Diante destes fatos, pode-se argumentar que as condições oferecidas pelo teste podem não ter favorecido o crescimento da linhagem Ar70C2, apesar da empresa ter a informação das necessidades de temperatura e salinidade da linhagem, que seriam de 55°C e 35 g/L de NaCl.

A composição de ácidos graxos celulares é mostrada na Figura 15. Os ácidos graxos celulares encontrados na linhagem Ar70C2 variam entre C14 e C18 e incluem componentes saturados, monoinsaturados e iso-ramificados. Os ácidos graxos encontrados em maior quantidade foram: C_{16:0} (ácido palmítico), iso-C_{15:0} (ácido iso-pentanodecanoico) e iso-C_{17:0} (ácido iso-heptadecanoico).

No caso das linhagens TM1^T e TM5 os ácidos graxos celulares de ambas as linhagens variaram entre C12 a C18 e incluem também componentes saturados, monoinsaturados e iso-

ramificados. Em ambas as linhagens, iso-C_{15:0}, iso-C_{16:0}, C_{16:0}, iso-C_{17:0} e anteiso-C_{17:0} foram os principais ácidos graxos encontrados⁸⁴. Nota-se, portanto, extrema semelhança na composição lipídica da linhagem Ar70C2 com as linhagens de *B. alveayuensis* já descritas em literatura.

E175114.03A [3839] UN-V-17-354-Ar70C2-BRASIL(FS,1d,55C)

Page 1

Volume: DATA File: E175114.03A Samp Ctr: 11 ID Number: 3839
 Type: Samp Bottle: 16 Method: TSBA40
 Created: 5/11/2017 1:47:25 PM
 Sample ID: UN-V-17-354-Ar70C2-BRASIL(FS,1d,55C)

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.631	3.691E+8	0.027	---	7.008	SOLVENT PEAK	---	< min rt	
6.748	698	0.031	0.998	13.619	14:0 ISO	0.33	ECL deviates 0.000	Reference -0.005
7.269	2413	0.038	0.986	13.999	14:0	1.14	ECL deviates -0.001	Reference -0.005
8.231	63724	0.040	0.971	14.624	15:0 ISO	29.74	ECL deviates 0.001	Reference -0.003
8.370	2439	0.037	0.969	14.714	15:0 ANTEISO	1.14	ECL deviates 0.001	Reference -0.003
8.812	468	0.032	0.962	15.001	15:0	0.22	ECL deviates 0.001	Reference -0.003
9.617	785	0.035	0.953	15.483	Sum In Feature 2	0.36	ECL deviates 0.003	16:1 ISO 1/14:0 3OH
9.857	27658	0.040	0.950	15.627	16:0 ISO	12.64	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
10.240	1463	0.042	0.947	15.857	Sum In Feature 3	0.67	ECL deviates 0.005	15:0 ISO 2OH/16:1w7c
10.476	28525	0.042	0.944	15.998	16:0	12.95	ECL deviates -0.002	Reference -0.005
11.278	1355	0.044	0.938	16.462	ISO 17:1 w5c	0.61	ECL deviates 0.001	
11.570	72613	0.045	0.936	16.630	17:0 ISO	32.66	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
11.729	10558	0.043	0.934	16.723	17:0 ANTEISO	4.74	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
12.212	542	0.044	0.931	17.002	17:0	0.24	ECL deviates 0.002	Reference -0.002
13.323	1868	0.044	0.925	17.631	18:0 ISO	0.83	ECL deviates -0.001	Reference -0.005
13.972	2845	0.045	0.922	17.998	18:0	1.26	ECL deviates -0.002	Reference -0.006
15.088	1059	0.043	0.918	18.635	19:0 ISO	0.47	ECL deviates 0.001	Reference -0.004
15.857	501	0.041	---	19.075		---		
---	785	---	---	---	Summed Feature 2	0.36	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
---	---	---	---	---	---	---	16:1 ISO 1/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 ISO 1
---	1463	---	---	---	Summed Feature 3	0.67	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0.002 Reference ECL Shift: 0.004 Number Reference Peaks: 13
 Total Response: 219514 Total Named: 219013
 Percent Named: 99.77% Total Amount: 207997

Matches:

Library Sim Index Entry Name
 TSBA40 4.10 0.146 Bacillus-thermocatenulatus** (55C)

Figura 15 - Resultado da análise de ácidos graxos celulares feita pela empresa DSMZ para o isolado em estudo.
 Fonte: Elaborada pela autora

4.2 Teste Gram

Os resultados obtidos no teste gram para o isolado Ar70C2 e para as linhagens usadas como controle são mostrados na Figura 16 e na Figura 17.

Figura 16 - Imagem da coloração de Gram da linhagem Ar70C2.
Fonte: Elaborada pela autora

Figura 17 - Imagem da coloração de Gram das bactérias controles, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (1000x).
Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com as imagens observadas na microscopia óptica pode-se notar que, comparando com as imagens do *Bacillus subtilis* e da *Escherichia coli*, a linhagem estudada possui coloração mais aproximada da coloração do *Bacillus subtilis*, indicando que ela é

gram-positiva. Esse fato corrobora com o que foi descrito no artigo de descrição das duas linhagens do *B. alveayuensis* (TM1^T e TM5), que descreve ambas como gram-positivas.⁸⁴

4.3 Coloração de Esporos

As imagens resultantes da coloração de esporos são mostradas logo abaixo.

Figura 18 – Imagem da coloração de esporos do controle positivo *Bacillus subtilis*.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 19 - Imagem da coloração de esporos da linhagem Ar70C2.
Fonte: Elaborada pela autora.

As imagens da coloração de esporos (Figura 18 e Figura 19) mostram a presença de endósporos (destacados com uma seta) na linhagem Ar70C2 após cultivo de 7 dias. Segundo a descrição das linhagens conhecidas de *B. alveayuensis*⁸⁴, ambas produzem endósporos elipsoidais que se encontram em posições terminais ou subterminais.

4.4 Ensaios de crescimento e de produção de biossurfactante pela linhagem Ar70C2

4.4.1 Teste de Salinidade

Este ensaio foi realizado para investigar a influência da salinidade no crescimento e produção de biossurfactante do isolado Ar70C2. As salinidades testadas foram 5, 25, 40 e 75 g/L de NaCl, em cultivos em caldo LB, incubados a 55°C e sem agitação por 7 dias. A Figura 20 mostra os padrões de crescimento e os índices de emulsificação E₂₄ registrados ao longo do experimento nas condições testadas.

Em relação ao crescimento, pode-se constatar pela análise dos gráficos que o isolado Ar70C2 atingiu os maiores valores de DO nas salinidades 40 e 75g/L de NaCl. Na salinidade de 40g/L o maior valor foi de 1,84 ($\pm 0,09$) em 96 horas de cultivo e na salinidade de 75g/L o maior valor foi de 1,82 ($\pm 0,11$) no mesmo tempo de cultivo. Houve um crescimento moderado nas salinidades de 0 e 20 g/L.

Em relação à análise da produção de biossurfactante através do E₂₄ nota-se, primeiramente, que a produção do biossurfactante ocorreu em todas as condições de salinidade testadas. Os maiores valores de E₂₄ foram atingidos com 120 horas de cultivo nas salinidades de 40 g/L e 75 g/L de NaCl: 73,42% ($\pm 1,31$) e 69,51% ($\pm 1,81$), respectivamente.

A partir desses resultados nota-se que tanto a salinidade de 40 como a de 70 g/L de NaCl parecem favorecer o crescimento e a produção de BS, portanto, optou-se por manter para testes posteriores a salinidade de 40 g/L de NaCl por usar uma quantidade menor do reagente e proporcionar o maior valor absoluto de E₂₄.

Figura 20 - Medidas de crescimento (densidade óptica – DO) e índices de emulsificação (E_{24}) registradas a partir dos cultivos da linhagem Ar70C2 em diferentes salinidades (5, 25, 40, e 75 g/L de NaCl).

Fonte: Elaborada pela autora.

A capacidade do isolado de crescer e produzir BS em uma ampla faixa de salinidade demonstra a possibilidade para sua aplicação em MEOR, pois durante este processo ele estará exposto a condições que, frequentemente, envolvem exposição a extremos de força iônica.⁹⁶

4.4.2 Teste do meio mineral em cultivos com e sem agitação

Como já relatado, o meio mineral (MM)⁶⁹ havia sido testado em ensaios prévios com a linhagem Ar70C2, resultando em bom crescimento com produção de biossurfactante, e por essa razão foi escolhido para os testes posteriores. Antes, porém, era preciso avaliar se a condição de agitação favorecia a produção de biossurfactante, já que os testes prévios foram feitos sem agitação. Os cultivos foram realizados em MM, com 35 g/L de NaCl, e incubados à temperatura de 55°C, na condição estática e em agitação de 100 rpm. Os resultados estão na Figura 21.

Figura 21 - Medidas de crescimento (DO) e índices de emulsificação (E₂₄) dos cultivos da linhagem Ar70C2 em MM, nas condições estática (a) e em agitação de 100 rpm (b).

Fonte: Elaborada pela autora

Em relação ao crescimento, pode-se constatar que o isolado Ar70C2 atingiu os maiores valores de DO na condição estática, sendo o maior valor médio de $0,36(\pm 0,01)$ alcançado em 171 horas de cultivo. Na condição com agitação de 100 rpm notou-se uma grande variação nos valores de DO, sendo que o maior valor médio atingido foi de $0,29(\pm 0,01)$ em 99 horas de cultivo. Em relação à análise da produção de biossurfactante através do E₂₄ notou-se, primeiramente, que a produção do biossurfactante ocorreu em ambas as condições testadas. Os maiores valores médios de E₂₄ foram atingidos na condição sem agitação, sendo o maior valor de $55,55\% (\pm 1,90)$ em 123h de cultivo. Para a condição em agitação de 100 rpm o maior valor médio de E₂₄ foi de $44,39\% (\pm 6,46)$ em 123 horas de cultivo. No geral, o E₂₄ das culturas em agitação foi sempre inferior em comparação com as culturas mantidas estáticas.

O melhor desempenho do isolado Ar70C2 com relação à produção de BS e quanto à regularidade no crescimento na condição estática pode ser explicada pelas condições do ambiente de origem da bactéria. A rocha de reservatório de petróleo da qual a bactéria foi isolada localizava-se em grande profundidade, tendo, por isso pouco oxigênio disponível.

Levando em conta essa informação, o resultado deste experimento pode ser explicado pelo fato de que quando se agita um cultivo aumenta-se a concentração de oxigênio disponível, o que parece não ser favorável para o isolado. O excesso de oxigênio dissolvido no cultivo, resultante da agitação, pode levar o isolado a esporular. Assumindo ser o BS produzido por esta linhagem um metabólito primário (associado ao crescimento do isolado) pois sua produção se inicia nas fases iniciais de crescimento, quando ocorre a esporulação a produção do mesmo pode ser reduzida.

Um estudo feito por Nagwa e colaboradores⁹⁶ em uma linhagem de *Bacillus cereus* isolado do tubo de drenagem de cozinha, constatou que a agitação do cultivo inibiu muito a produção de biossurfactante pela bactéria.

Abushady e colaboradores⁹⁷ estudaram a produção de surfactina por duas linhagens de *B. subtilis* BBk1: AB01335-1 e AB02238-1. A influência da velocidade de agitação foi estudada mantendo as culturas inoculadas em diferentes velocidades de agitação no intervalo entre 0 e 200 rpm. Foi demonstrado que um aumento na velocidade de agitação de até 150 rpm resulta em um aumento na produção de surfactina, mas valores acima dessa velocidade prejudicam a produção. Isto pode ser devido ao efeito de cisalhamento que ocorre em velocidades superiores a 150 rpm.

4.4.3 Teste de fontes de Carbono (C)

Após a definição das condições ótimas de salinidade e agitação, ensaios foram realizados em busca de uma fonte de carbono que favorecesse o crescimento e a produção de biossurfactante pelo isolado Ar70C2. O critério para a escolha das fontes de carbono foi a ideia de se utilizar fontes de baixo custo, com o objetivo de baratear o processo de produção do BS. As fontes de baixo custo testadas foram melaço, soro de leite de búfala, óleo de cozinha usado e glicerina vegetal, além das fontes tipo P.A. (para análise) glicose e sacarose. Os ensaios foram feitos em meio mineral na salinidade de 35 g/L de NaCl e incubação em temperatura de 55°C nas condições: estática e em agitação de 100 rpm, com e sem extrato de levedura. A Figura 22 e a Figura 23 apresentam os resultados obtidos nos testes estático e em agitação de 100 rpm, respectivamente.

Figura 22 - Resultados do teste de fonte de carbono para o isolado Ar70C2, estático, sem (a) e com (b) extrato de levedura (EL).

Fonte: Elaborada pela autora.

a

b

Figura 23 - Resultados do teste de fonte de carbono para o isolado Ar70C2, em agitação de 100 rpm, sem (a) e com (b) extrato de levedura (EL).

Fonte: Elaborada pela autora.

As fontes de carbono que resultaram em melhor desempenho foram glicose, melaço e glicerina vegetal em condição estática e sem extrato de levedura: com glicose, registrou-se

uma DO máxima de 1,96 em 168 horas de cultivo e um E_{24} médio de 65% em 120 horas de cultivo; com melaço, uma DO máxima de 2,0 em 168 horas de cultivo e um E_{24} médio de 60% em 98 horas de cultivo; com a glicerina, uma DO máxima de 0,7 em 168h de cultivo e um E_{24} médio de 54% em 48 horas de cultivo.

O uso de fontes de baixo custo tem sido frequentemente relatado como uma alternativa mais econômica para a produção de BS com vistas na utilização em MEOR. Existem estudos que avaliaram o desempenho diversas linhagens, incluindo *Bacillus*, na produção de BS utilizando tais fontes em condições próximas a de reservatórios.

Makkar e colaboradores⁹⁸ utilizaram o melaço em um estudo com duas linhagens de *Bacillus subtilis* (MTCC 2423 e MTCC 1427) para investigar o crescimento e a produção e biossurfactante, a 45 °C. Como resultado, destaca-se, a redução de tensão superficial do meio para 29 e 31 mN/M pelas duas linhagens, respectivamente.

Updegraff⁹⁹ relatou a aplicação de biossurfactantes produzidos a partir de melaço como substrato em MEOR. O melaço pode ser usado porque pode ser injetado junto com culturas bacterianas nos poços de petróleo para a recuperação avançada do óleo. A cultura bacteriana injetada utilizaria então o melaço como substrato de crescimento e deslocaria o óleo, ou pela produção de surfactantes ou produção de gás, resultando na redução da viscosidade do óleo.

Joshi e colaboradores¹⁰⁰ estudaram a produção de biossurfactante por *Bacillus licheniformis* W16 a 40°C com diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose, amido, e dois tipos de melaços) em dois diferente meios minerais, e observaram que os menores valores de tensão superficial e interfacial foram registrados em meio contendo glicose, melaço de cana e melaço de tâmara.

Alguns trabalhos exploram a glicerina vegetal ou glicerol para a produção de biossurfactantes. Sousa e colaboradores¹⁰¹ utilizaram uma glicerina hidrolisada, co-produto da produção de biodiesel, resultante da transesterificação do óleo de mamona em meio alcalino para avaliar a produção de biossurfactantes pela linhagem *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02. O uso de 2% (p/v) desta glicerina como fonte de carbono resultou na produção de um BS (tipo ramnolípídeo) com elevada estabilidade frente à variação de salinidade, pH e temperatura e a capacidade de emulsificar querosene, em solução aquosa de ramnolípídeo com 10% de NaCl, com valor máximo de 80%.

De Faria e colaboradores¹⁰² estudaram a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* LSFM-05 utilizando glicerol bruto, obtido de uma usina de biodiesel de óleo de soja no Brasil, como única fonte de carbono. Os resultados mostraram que o BS produzido

demonstrou uma alta capacidade emulsificante, exibindo valores de E_{24} de 67,6% e 59,1% contra petróleo bruto e querosene, respectivamente.

O glicerol padrão já tem sido estudado para a produção de raminolipídios por *Pseudomonas aeruginosa*.¹⁰³ Morita e colaboradores¹⁰⁴ também relataram a conversão de glicerol residual em glicolipídios por *Pseudozyma antarctica* JCM 10317^T e Rooney e colaboradores¹⁰⁵ isolaram espécies bacterianas produtoras de ramnolipídios a partir de solo coletado em plantas de produção de biodiesel. A seleção foi baseada na capacidade dessas linhagens de produzir biossurfactantes em meios contendo glicerol como única fonte de carbono. Estes resultados mostram que o glicerol pode ser utilizado, alternativamente, nos processos de produção de biossurfactantes.

O glicerol é um substrato orgânico que pode ser utilizado em processos biotecnológicos. Este pode ser produzido por fermentação microbiana, síntese química ou recuperado como subproduto dos processos de fabricação de sabão. Grandes quantidades de glicerol também são obtidas através da transesterificação de óleos vegetais e animais que ocorre durante a produção de biodiesel. Segundo a ANP (Agência Nacional do Petróleo), a produção de glicerol representa o equivalente a 10% (v/v) da produção total de biodiesel. Devido a crescente necessidade por combustíveis renováveis e um significativo aumento da demanda de produção de biodiesel, um excesso de glicerol estará disponível em todo mundo.¹⁰⁶

No caso do experimento realizado no presente trabalho utilizou-se a glicerina bidestilada vegetal da marca Buckminster, que é derivada do óleo de soja.

Os biossurfactantes são importantes para o crescimento microbiano e a sobrevivência no meio ambiente. Algumas funções fisiológicas sugeridas dos biossurfactantes incluem o aumento da área superficial e da biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos insolúveis em água, ligação de metais pesados, patogênese bacteriana, detecção de *quórum sensing* e formação de exopolissacarídeos.⁴⁴ Pode-se notar que o isolado Ar70C2 tem preferência por utilizar fontes de carbono hidrossolúveis para o crescimento e produção de BS (glicerina vegetal, glicose e melão), o que pode indicar que o BS é produzido como um metabólito primário, que é um metabolismo constitutivo (relacionado com o crescimento), ou seja, não está relacionado com a captação de substratos hidrofóbicos em um primeiro momento.

O isolado usado neste estudo mostrou ter um potencial promissor porque pode utilizar o melão e a glicerina vegetal a 55°C para produzir biossurfactante, o que, futuramente, poderá baratear o processo de produção de BS, com a possibilidade de ser adaptado às condições de campo para MEOR.

4.4.4 Teste de Temperaturas

Os experimentos para o teste de temperatura foram realizados em três etapas. Em uma primeira etapa, foram realizados testes nas temperaturas de 37, 45, 55 e 65°C (Figura 24).

Figura 24 - Crescimento da linhagem Ar70C2 registrado em cultivos nas temperaturas de 37, 45, 55 e 65°C, em caldo LB com salinidade de 35g/L de NaCl.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota-se, primeiramente, que o isolado Ar70C2 cresceu em todas as condições de temperatura testadas, embora o crescimento a 37°C tenha sido pouco expressivo, atingindo uma DO máxima de, em média, 0,27 ($\pm 0,02$) em 48 horas de cultivo.

Como 55°C foi a temperatura que o microrganismo foi isolado no início deste projeto, já era esperado que o crescimento nesta condição fosse favorecido, portanto, podemos tomá-la como uma referência. Nesta condição a DO máxima atingida foi de, em média, 1,89 ($\pm 0,06$) em 48 horas de cultivo.

O crescimento em 45°C foi muito semelhante ao crescimento em 55°C, com DO máxima atingida de, em média, 1,89 ($\pm 0,06$) em 48 horas de cultivo. Já em 65°C o crescimento foi mais expressivo, ultrapassando a média de DO máxima de 55°C, atingindo uma média de DO de 2,00 ($\pm 0,15$) em 48 horas de cultivo.

Em uma segunda etapa do ensaio, foram testadas as temperaturas de 55, 65 e 70°C, avaliando-se o crescimento e a produção de biossurfactante (Figura 25).

Figura 25 – Crescimento (DO) e índice de emulsificação (E_{24}) registrados em cultivos da linhagem Ar70C2 nas temperaturas de 55, 65 e 70°C, em caldo LB com salinidade de 35g/L de NaCl.

Fonte: Elaborada pela autora

Neste segundo teste notou-se que o cultivo sob temperatura de 70°C não resultou em crescimento e produção de biossurfactante. Sob temperatura de 55°C, os maiores valores de DO e E_{24} foram registrados no tempo de 72 horas de cultivo, sendo respectivamente 1,68 ($\pm 0,08$) e 55,6% ($\pm 7,0$). Os resultados também mostraram que o isolado cresceu e produziu biossurfactante na temperatura de 65°C. O valor máximo de DO foi 1,9 ($\pm 0,08$) em 72 horas de cultivo, e o E_{24} máximo registrado foi de 46,4% ($\pm 9,46$) também em 72 horas de cultivo. Nesta temperatura, em média, o rendimento celular foi superior ao da temperatura de 55°C, porém os valores de E_{24} foram inferiores.

Nesta etapa também foram realizadas medidas de massa seca de BS produzido como critério de avaliação na escolha da melhor temperatura de cultivo para a produção de BS. As massas secas de BS obtidas a partir dos cultivos sob as temperaturas de 55, 65 e 70°C foram de, respectivamente, 0,40g, 0,625g e 0,152g por litro de meio de cultura.

Salientando-se que o valor de massa seca do BS extraído do cultivo a 55°C foi obtido a partir de um cultivo realizado em momento anterior, incubado por 4 dias, diferentemente do tempo de incubação de 7 dias dos cultivos nas temperaturas de 65 e 70°C.

Assim, para confirmar os valores registrados para os cultivos de 55 e 65°C, uma terceira etapa de testes foi realizada com incubação de novos cultivos por 6 dias e realização de medidas de DO, E₂₄, tensão superficial e massa seca do BS.

Os resultados para as medidas de DO e E₂₄ desta terceira etapa estão apresentados na Figura 26. Os rendimentos, em massa de BS, obtidos a partir dos processos de precipitação das culturas mantidas nas temperaturas de 55 e 65°C foram, respectivamente, 0,428g e 0,368g.

Da análise dos resultados sobre o crescimento celular nota-se que a DO atingida pela cultura que permaneceu a 65°C é superior à DO da cultura mantida a 55°C a partir do tempo de 48 horas. O maior valor de DO atingido pela cultura mantida a 65°C foi, em média, 1,90 ($\pm 0,09$) em 144 horas de cultivo. Já para a cultura mantida em a 55°C a maior DO foi, em média, 1,74 ($\pm 0,06$) em 144h horas de cultivo.

Em relação à produção de BS, analisando-se o E₂₄, nota-se que para todos os tempos testados seu valor é sempre superior para as culturas mantidas a 55°C. Para esta temperatura o maior valor de E₂₄ foi, em média, de 59,06% ($\pm 5,84$) em 144 horas de cultivo. Para a temperatura de 65°C o E₂₄ máximo foi de, em média, 35,98% ($\pm 4,29$) em 144 horas de cultivo.

Figura 26 - Crescimento e índice de emulsificação (E₂₄) registrados em cultivos da linhagem Ar70C2 nas temperaturas de 55 e 65°C, em caldo LB com salinidade de 35g/L de NaCl.

Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando-se os resultados de tensão superficial do BS (Tabela 8) nota-se que para ambas as temperaturas testadas não ocorreu expressiva redução de tensão superficial, em relação ao branco (meio LB 35 modificado sem inóculo). Pode-se concluir que o isolado em estudo produz um BS do tipo que tem mais potencial emulsificante do que redutor de tensão superficial.

Tabela 8 – Valores médios de tensão superficial (TS, em mN/m) registrados nos caldos livres de células dos cultivos de Ar70C2 mantidos a 55 e 65°C.

Tempo (h)	TS em 55°C	TS em 65°C	TS Controle
48	51,64 ($\pm 0,83$)	51,64 ($\pm 0,62$)	52,90 ($\pm 0,32$)
96	50,73 ($\pm 0,80$)	50,73 ($\pm 0,64$)	
144	51,63 ($\pm 0,62$)	51,63 ($\pm 0,63$)	

Fonte: Elaborada pela autora

Diante dos resultados de todas as etapas, a temperatura de 55°C foi escolhida como ótima para o crescimento e produção de BS para isolado Ar70C2.

Espécies de *Bacillus* termofílicas, com uma temperatura ótima de crescimento situada entre 45 e 70°C, foram isoladas de uma ampla gama de ambientes e as características cruciais associadas à tolerância ao calor têm sido amplamente documentados como, por exemplo, a produção de enzimas termoestáveis que propiciam a sobrevivência nesses tipos de ambiente.¹⁰⁷ A maioria delas é não-patogênica e competente na produção de várias substâncias biológicas, como proteínas secretadas, enzimas, exopolissacarídeos, biossurfactantes e antibióticos¹⁰⁸. Pakpitcharoena e colaboradores¹⁰⁸ estudaram bactérias termotolerantes isoladas de amostras de solo e água retiradas de 76 fontes termais na Tailândia, investigando suas propriedades biossurfactantes, biocatalíticas e antimicrobianas. A maioria dos isolados foi identificada como pertencente ao gênero *Bacillus*. A determinação de suas propriedades biossurfactantes foi investigada utilizando a técnica de espalhamento de óleo. Os resultados indicaram que três isolados possuíam a mais alta atividade biossurfactante: *B. megaterium* (SR8.5), *B. licheniformis* (CM8.2) e *B. pumilus* (SR4.4).

Makkar e Cameotra¹⁰⁹ estudaram a capacidade de uma linhagem de *Bacillus subtilis* crescer e produzir biossurfactante sob condições termofílicas (45°C). A produção de

biossurfactantes pela cepa a 45°C e sua natureza estável sugerem sua possível utilização em campos de petróleo.

4.4.5 Influência da solução de elementos-traço

Este experimento foi feito com o objetivo de verificar a influência exercida pela solução de elementos-traço (cuja composição é descrita no item 3.1) no crescimento do isolado e sobre sua produção de BS. Os resultados destes ensaios são apresentados na Figura 27 e na Tabela 9.

Figura 27 - Resultados de densidade óptica (DO) e de índice de emulsificação E₂₄ registrados a partir dos cultivos da linhagem Ar70C2 em meio mineral com e sem solução-traço.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 9 - Valores médios de tensão superficial (TS, em mN/m) registrados nos caldos livres de células dos cultivos de Ar70C2 em meio mineral com (a) e sem solução-traço (b).

	(a) Meio com solução-traço	(b) Meio sem solução-traço
TS do caldo	48,66 (± 0,67)	50,93 (± 0,87)
TS do controle	60,95(± 0,37)	62,43 (± 0,33)

Fonte: Elaborada pela autora

Diante das diferenças sutis resultantes da adição ou ausência de solução-traço no que diz respeito, principalmente, a valores resultantes de DO e E₂₄ foi realizada uma análise estatística conforme descrito no item 3.4.1.7. Esta se concentra em mostrar se a ausência ou a presença de solução traço produzem resultados de E₂₄ e DO que são estatisticamente iguais ou diferentes, assim pode-se afirmar se existe ou não diferença real entre adicionar ou não a solução. Os resultados desta análise são mostrados no Apêndice A.

Apesar da análise estatística mostrar que, tanto para valores de DO como para valores de E₂₄, as médias não são significativamente diferentes, escolhemos manter a solução-traço nos experimentos seguintes.

Em relação à tensão superficial (Tabela 9), nota-se que em ambos os casos ocorreu uma redução moderada de tensão, em relação à TS do branco. Contudo existe uma pequena vantagem na cultura com adição de solução-traço, que apresentou uma redução de, em média, 12,3 unidades de tensão superficial; na cultura sem solução-traço esta redução é de, em média, 11,5 mN/m.

Alguns estudos investigaram a influência dos elementos-traço no crescimento e produção de BS por bactérias. Em um deles Makkar e Cameotra⁴⁶ analisaram os efeitos da adição de vários suplementos metálicos no crescimento e a produção de BS por *Bacillus subtilis* MTCC 2423. Como resultado observaram que a produção de biossurfactante aumentava consideravelmente (quase o dobro) pela adição de suplementos metálicos; no entanto, concentrações muito elevadas inibiram a produção.

Gudiña e colaboradores¹¹⁰ estudaram a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* utilizando milhocina como meio de cultura. Neste trabalho o efeito da adição de diferentes metais (ferro, manganês e magnésio) em diferentes concentrações na produção de biossurfactante foi avaliado a fim de tentar aumentar a produção de biossurfactante. Os resultados obtidos mostram que a suplementação do meio com os diferentes metais resultou em um aumento na produção de biossurfactante em todos os casos quando comparado com o meio sem suplementos, embora para cada metal esse efeito fosse dependente da concentração utilizada. Como justificativa pode-se levar em consideração que ferro, manganês e magnésio são co-fatores de enzimas envolvidas na síntese de surfactina por *B. subtilis*. Portanto, a concentração destes elementos no meio de cultura desempenha um papel importante na produção de biossurfactantes.

4.4.6 Teste das fontes de Nitrogênio (N)

O elemento nitrogênio (N) é um dos suplementos mais importantes para a produção de biossurfactantes por microrganismos e por essa razão foi feito o teste para escolha da melhor fonte de N presente no meio de cultura. As fontes escolhidas foram NaNO_3 , NH_4Cl e NH_4NO_3 , testadas cada uma com as seguintes fontes de carbono: glicerina vegetal, melaço e glicose. O objetivo foi buscar uma combinação de fonte de C e fonte de N que maximizasse a produção de BS.

Os resultados obtidos neste teste em relação ao crescimento e produção de BS são apresentados na figura 28; as medidas de tensão superficial em 144 horas de cultivo estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores médios tensão superficial (TS em mN/m, média de triplicatas) registrados nos caldos livres de células obtidos dos cultivos realizados com as fontes de N e C selecionadas, após 144 horas de cultivo.

(a)	TS NaNO_3 + Glicose
Branco	Média
$58,40 \pm 0,69$	$48,92 (\pm 0,62)$
	TS NH_4Cl + Glicose
Branco	Média
$57,20 \pm 0,38$	$48,92 (\pm 0,62)$
	TS NH_4NO_3 + Glicose
Branco	Média
$57,13 \pm 0,33$	$48,92 (\pm 0,62)$
(b)	TS NaNO_3 + Melaço
Branco	Média
$51,36 \pm 0,37$	$48,92 (\pm 0,62)$
	TS NH_4Cl + Melaço
Branco	Média
$61,89 \pm 0,36$	$52,53 (\pm 0,80)$
	TS NH_4NO_3 + Melaço
Branco	Média
$57,297 \pm 0,513$	$51,10 (\pm 0,75)$
(c)	TS NaNO_3 + Glicerina Vegetal
Branco	Média
$59,78 \pm 0,20$	$51,09 (\pm 0,62)$
	TS NH_4Cl + Glicerina Vegetal
Branco	Média
$60,343 \pm 0,284$	$54,17 (\pm 0,66)$
	TS NH_4NO_3 + Glicerina Vegetal
Branco	Média
$59,34 \pm 0,20$	$53,92 (\pm 0,65)$

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 28 - Resultados de densidade óptica (DO) e de índice de emulsificação E_{24} registrados a partir dos cultivos da linhagem Ar70C2 em meio mineral realizados no teste das fontes de N. Em (a) estão apresentados os resultados para a glicose, em (b) para o melaço e em (c) para a glicerina vegetal.

Fonte: Elaborada pela autora

Para a glicose, em relação ao crescimento bacteriano, os melhores resultados ocorreram em 48 horas de cultivo para as fontes de nitrogênio NaNO_3 e NH_4Cl , com valores médios de DO de 0,54 ($\pm 0,02$) e 0,55 ($\pm 0,01$), respectivamente. Já para a fonte NH_4NO_3 o maior valor de DO foi, em média, 0,45 ($\pm 0,02$) em 72 horas de cultivo. Em relação à produção de BS, os melhores resultados ocorreram em 96 horas de cultivo para as fontes NaNO_3 e NH_4NO_3 , atingindo valores médios de E_{24} de 60,32% ($\pm 3,13$) e 61,41% ($\pm 6,96$), respectivamente. Para a fonte NH_4Cl o maior valor de E_{24} foi, em média, 59,40% ($\pm 5,22$) em 120 horas de cultivo. A redução da tensão superficial, em relação aos valores obtidos com os meios de cultura sem inóculo (brancos), foi pouco expressiva, sendo, em média, de 9 unidades.

Para o melão, em relação ao crescimento bacteriano, os melhores resultados ocorreram em 24 horas de cultivo para todas as fontes de nitrogênio testadas, com valores médios máximos de DO de 0,420 ($\pm 0,008$), 0,38 ($\pm 0,02$) e 0,43 ($\pm 0,02$) para as fontes de nitrogênio NaNO_3 , NH_4Cl e NH_4NO_3 , respectivamente. Em relação à produção de BS, os melhores resultados ocorreram em 120 horas de cultivo para as fontes NaNO_3 e NH_4NO_3 , atingindo, respectivamente, valores médios de E_{24} médio de 63,59% ($\pm 1,90$) e 61,01% ($\pm 4,24$). Para a fonte NH_4Cl o maior valor médio de E_{24} foi 62,08% ($\pm 4,85$) em 96 horas de cultivo. A maior redução da tensão superficial registrada foi de 9,35 unidades para a fonte NH_4Cl .

Para a glicerina vegetal, em relação ao crescimento bacteriano, os melhores resultados ocorreram em 144 horas de cultivo para as fontes de nitrogênio NaNO_3 e NH_4NO_3 , atingindo valores médios de DO de 0,57 ($\pm 0,09$) e 0,71 ($\pm 0,01$), respectivamente. Já para a fonte NH_4Cl o maior valor médio de DO foi 0,66 ($\pm 0,01$) em 120 horas de cultivo. Em relação à produção de BS, os melhores resultados ocorreram em 96 horas de cultivo para a fonte NaNO_3 e em 120h para NH_4NO_3 e NH_4Cl , atingindo, respectivamente, valores médios de E_{24} de 59,36% ($\pm 2,00$), 54,16% ($\pm 3,67$) e 50,36 ($\pm 3,88$). A maior redução da tensão superficial ocorreu para a fonte NaNO_3 , que reduziu a tensão de 8,69 unidades.

Como os valores de índice de emulsificação foram todos muito próximos nos ensaios realizados, procedemos à análise estatística para selecionar a melhor combinação de fontes de nitrogênio e carbono. A análise foi realizada conforme descrito no item 3.7. Primeiramente, foi feita uma análise fixando-se as fontes de carbono e analisando-se quais fontes de nitrogênio poderiam ser estatisticamente diferentes no favorecimento do E_{24} . Para a realização destas análises foi utilizada a comparação de Tukey, com confiança de 95%, para testar se a diferença entre um par de grupos é estatisticamente significativa (Apêndices B, C e D).

Observando a comparação entre todos os experimentos, nota-se que todas as fontes de nitrogênio são estatisticamente equivalentes, ou seja, todas favorecem a produção de BS da mesma maneira, não existindo, portanto, uma fonte melhor ou pior.

Também foi realizada uma análise estatística considerando os tempos de cultivo, pois notou-se que a partir do tempo 96 horas de cultivo, para todos os experimentos realizados, o E_{24} pareceu atingir um valor máximo que permaneceu com pouca variação até 144 horas de cultivo. O resultado desta análise está apresentado no Apêndice E. Nota-se que ocorre uma equivalência do tempo de 96 horas com os tempos de 120 e 144 horas, além da equivalência do tempo de 120 horas com 144 horas. A partir desses resultados o tempo de 96 horas foi padronizado para os ensaios, ou seja, os cultivos foram incubados por 96 horas em estufa a 55°C, tempo este fixado para a retirada das alíquotas para a medição do índice E_{24} .

Devido às equivalências entre as fontes de nitrogênio não foi possível chegar a uma conclusão de qual combinação de fontes de nitrogênio e carbono favoreceu mais a produção de BS. Por esta razão uma segunda etapa dos testes de fonte de nitrogênio foi realizada, desta vez tomando-se como parâmetro a quantidade de massa seca de BS produzido. Também foram feitas medidas de massa seca de células (Tabela 11).

Tabela 11 - Massa seca de BS e de células, em grama (g), obtidas por precipitação ácida de 1 litro de cultivo.

Fonte de Nitrogênio	Fonte de Carbono	Massa de células (g)	Massa de BS (g)
NaNO ₃	Glicose	0,3810	0,1235
NaNO ₃	Glicerina Vegetal	0,6416	0,3922
NaNO ₃	Melaço	1,2880	0,1531
NH ₄ Cl	Glicose	0,3539	0,1386
NH ₄ Cl	Glicerina Vegetal	0,6409	0,2549
NH ₄ Cl	Melaço	0,5517	0,1515
NH ₄ NO ₃	Glicose	0,1700	0,1672
NH ₄ NO ₃	Glicerina Vegetal	0,4715	0,2407
NH ₄ NO ₃	Melaço	0,2291	0,1884

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 29 - Foto do meio de cultura após a precipitação ácida, com a fonte de C glicerina vegetal e fonte de N NaNO_3 .

Fonte: Elaborada pela autora

Analisando-se a tabela 11 pode-se notar que o cultivo com glicerina vegetal e NaNO_3 produziu a maior quantidade de massa de BS - 0,3922 g (Figura 29). Diante desses resultados, a combinação entre a fonte de carbono glicerina vegetal e a fonte de nitrogênio NaNO_3 foi selecionada como sendo a mais favorável para o crescimento e produção de BS pelo isolado Ar70C2.

A fonte NaNO_3 também foi avaliada por outros pesquisadores em experimentos para a produção de biossurfactantes, fornecendo bons resultados. Abdel-Mawgoud e colaboradores¹¹¹ relataram a produção mais elevada de biossurfactante por *Bacillus subtilis* BS5 ao se utilizar nitrato de amônio e nitrato de sódio como fontes de nitrogênio. Makkar e Cameotra⁸ concluíram que alguns isolados de *Bacillus* não foram capazes de utilizar o sulfato de amônio para produção de biossurfactante ou biomassa; no entanto, eles foram capazes de utilizar nitrato de amônio, nitrato de sódio e nitrato de potássio. Dastgheib¹³ e colaboradores registraram que o nitrato de sódio foi o melhor substrato para a produção de emulsificante por uma cepa de *Bacillus halotermofílico*, seguido por uréia, extrato de levedura e peptona. Fontes de nitrogênio mais complexas podem fornecer maiores índices de emulsificação; no entanto, seu custo também é maior, o que torna uma possível aplicação em MEOR economicamente inviável. Além disso, o nitrato é crucial para o crescimento microbiano sob as baixas concentrações de oxigênio presentes nos reservatórios.¹¹²

4.4.7 Otimização da relação Carbono/Nitrogênio (C/N)

Para a otimização do meio de cultura para a produção de BS realizou-se também uma última etapa, que avaliou algumas proporções da relação C/N (Figura 30). A relação C/N exigida em cultivos microbianos com fins de produção de BS depende do tipo de microrganismo utilizado, dos tipos de fontes de carbono e nitrogênio, das condições de cultura e do produto desejado.¹¹³

Figura 30 - Resumo das etapas de otimização do meio de cultura para a produção de BS pelo isolado Ar70C2.
Fonte: Elaborada pela autora

O primeiro ensaio realizado foi planejado segundo o método de *design* de composto central de face centrada (CCD), cujos resultados gerados podem ser dispostos em um gráfico que mostra uma superfície de resposta. Dois fatores independentes - as concentrações da fonte de carbono glicerina (2, 4 e 8 g/L) e da fonte de nitrogênio NaNO_3 (0,5, 1 e 2 g/L) - foram fixados. O experimento desenhado pelo software Minitab® 18 resultou em 14 corridas, das quais 6 são de ponto central (com concentrações intermediárias das fontes de C e de N), para avaliar a magnitude do erro experimental. As respostas analisadas foram o índice de emulsificação (E_{24}) e a massa seca de BS produzido. Estes resultados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados do índice de emulsificação e da massa, em gramas, do BS produzido nos experimentos de otimização do C/N.

Frasco	Condição	E ₂₄ – média (DP)	Massa (g)
1	C=4g/L, N=1g/L, C/N=4	59,07 (±2,10)	0,21
2	C=8g/L, N=2g/L, C/N=4	58,90 (±2,74)	0,24
3	C=2g/L, N=2g/L, C/N=1	61,29 (±8,44)	0,17
4	C=4g/L, N=1g/L, C/N=4	60,23 (±1,44)	0,18
5	C=8g/L, N=0,5g/L, C/N=16	55,68 (±3,77)	0,16
6	C=4g/L, N=1g/L, C/N=4	59,55 (±0,52)	0,19
7	C=2g/L, N=0,5g/L, C/N=4	61,11 (±1,61)	0,28
8	C=8g/L, N=1g/L, C/N=8	59,75 (±2,15)	0,24
9	C=4g/L, N=2g/L, C/N=2	59,75 (±3,93)	0,26
10	C=4g/L, N=1g/L, C/N=4	56,82 (±3,47)	0,17
11	C=2g/L, N=1g/L, C/N=2	59,52 (±2,61)	0,37
12	C=4g/L, N=0,5g/L, C/N=8	64,29 (±2,75)	0,36
13	C=4g/L, N=1g/L, C/N=4	59,16 (±3,34)	0,25
14	C=4g/L, N=1g/L, C/N=4	63,33 (±3,85)	0,21

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise desses resultados (feita no software Minitab18) gerou uma superfície de resposta, que levou em conta as concentrações de glicerina e de NaNO₃ testadas para tentar maximizar a resposta (no caso, o E₂₄) (Tabela 13, Equação 2 e Figura 31).

Tabela 13 - Ajuste dos resultados obtidos de E_{24} nas combinações das concentrações de NaNO_3 e de glicerina vegetal, utilizando o programa Minitab18.

Regressão de Superfície de Resposta: E_{24} versus Glicerina; NaNO_3					
Análise da variância					
Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	5	109,089	21,8178	1,72	0,155
Linear	2	72,853	36,4267	2,87	0,070
Glicerina	1	0,070	0,0701	0,01	0,941
NaNO_3	1	72,839	72,8390	5,74	0,022
Quadrado	2	1,599	0,7995	0,06	0,939
Glicerina*Glicerina	1	1,545	1,5450	0,12	0,729
$\text{NaNO}_3*\text{NaNO}_3$	1	0,497	0,4970	0,04	0,844
Interação com 2 Fatores	1	17,098	17,0980	1,35	0,253
Glicerina* NaNO_3	1	17,098	17,0980	1,35	0,253
Erro	36	456,679	12,6855		
Falta de ajuste	3	73,645	24,5482	2,11	0,117
Erro puro	33	383,034	11,6071	*	*
Total	41	565,768			
S	R^2	$R^2(\text{aj})$	$R^2(\text{pred})$		
3,56167	19,28%	8,07%	0,00%		

Fonte: Elaborada pela autora

$$E_{24} = 65,09 - 0,11 \text{ Glicerina} - 6,50 \text{ NaNO}_3 - 0,055 \text{ Glicerina*Glicerina} + 0,50 \text{ NaNO}_3*\text{NaNO}_3 + 0,511 \text{ Glicerina*NaNO}_3$$

Equação 2 - Equação de Regressão em unidades não codificadas.

Figura 31 - Superfície de resposta gerada pelo programa Minitab18, representando as concentrações de NaNO₃ e glicerina que maximizam o E₂₄.

Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando os resultados do ajuste, nota-se primeiramente na Figura 31, que a concentração de glicerina vegetal igual a 2 g/L e a concentração de NaNO₃ igual a 0,5 g/L (C/N de 4) foram selecionadas como aquelas que maximizam os valores de E₂₄ (que atinge, por volta de, 62,5%). Contudo, analisando-se a tabela 12 nota-se que o valor do R² obtido é muito pequeno (19,28%), refletindo que o modelo não explica os dados, e que o resultado que maximiza o E₂₄ é praticamente ao acaso. Portanto, seria imprudente afirmar algo com esse conjunto de dados e suas respostas geradas.

Diante desses resultados, uma segunda etapa da otimização foi necessária. Nesta, os cultivos da etapa anterior que apresentaram maiores valores de E₂₄ – Frasco 7, Frasco 11, Frasco 12 e Frasco 14 - foram escolhidos para a continuidade dos testes (cultivos em batelada, com réplicas). Os resultados das medidas de E₂₄, tensão superficial (TS) e massa de BS destes cultivos estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Valores médios de E_{24} , tensão superficial (TS, em mN/m) e massa seca (g/L) do BS produzido nos cultivos da segunda etapa de otimização da relação C/N.

Frasco 7 - C = 2 e N = 0,5 (C/N = 4)			
T (h)	E_{24} Médio	TS Média	Massa Média
96	62,54 ($\pm 3,13$)	45,86 ($\pm 1,67$)	0,1487 ($\pm 0,004$)
Frasco 14 - C = 4 e N = 1 (C/N = 4)			
T (h)	E_{24} Médio	TS Média	Massa Média
96	61,62 ($\pm 2,17$)	46,41 ($\pm 1,74$)	0,1507 ($\pm 0,005$)
Frasco 12 - C = 4 e N = 0,5 (C/N = 8)			
T (h)	E_{24} Médio	TS Média	Massa Média
96	65,41 ($\pm 0,77$)	46,61 ($\pm 2,34$)	0,1347 ($\pm 0,006$)
Frasco 11 - C = 2 e N = 1 (C/N = 2)			
T (h)	E_{24} Médio	TS Média	Massa Média
96	57,76 ($\pm 4,36$)	47,03 ($\pm 2,21$)	0,1487 ($\pm 0,022$)

Fonte: Elaborada pela autora

Analisando-se os resultados, notou-se que para todas as condições de C/N testadas os resultados de E_{24} , tensão superficial e massa de BS produzido foram próximos, todos parecendo favorecer a produção de BS, demandando, por isso uma análise estatística desses resultados. As análises estatísticas foram realizadas a partir das medidas de E_{24} , TS e massa seca de BS por meio do teste de ANOVA (realizado no *software* Minitab18, resultados mostrados na Tabela 15), com nível de significância de 5%, seguido do teste de Tukey.

A Figura 32 mostra uma foto da massa seca do BS obtido da condição do Frasco 7, após os processos de precipitação e secagem (chamado de BS bruto semi-purificado). As comparações entre as médias dos diferentes tratamentos (condições C/N) são apresentadas no Apêndice F.

Tabela 15 – Resultados do teste de ANOVA para: (a) valores de E_{24} , (b) valores de tensão superficial (TS, mN/m) e (c) massa de BS produzido (g/L)

(a) Tabela ANOVA para os valores de E_{24}				
Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	F	p-Value
Frascos	3	179,9	7,03	0,002
Erro	20	170,7		
Total	23	350,6		
(b) Tabela ANOVA para os valores de TS				
Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	F	p-Value
Frascos	3	21,21	2,32	0,079
Erro	116	353,17		
Total	119	374,37		
(c) Tabela ANOVA para os valores de Massa				
Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	F	p-Value
Frascos	3	4,4E-05	1,06	0,42
Erro	8	1,12E-04		
Total	11	1,56E-04		

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 32 - Foto da massa seca do BS obtido na condição do Frasco 7, após os processos de precipitação e secagem.

Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando-se a Tabela 15 (e o resultado dos testes estatísticos apresentados no Apêndice F) nota-se que as variações observadas entre as diferentes relações C/N, medidas em termos de E_{24} , TS e massa seca, não são estatisticamente significativas, em sua maioria.

Somente as condições dos Frasco 3 e Frasco 1 e do Frasco 3 e Frasco 2 não são equivalentes em relação ao E₂₄. Em relação à massa de BS produzida e a TS todas as condições são equivalentes.

Com base nesses resultados, e tendo em vista uma futura aplicação do BS produzido pelo isolado Ar70C2, optou-se pela escolha da condição C = 2 e N = 0,5 (C/N = 4, Frasco 7) para produção de massa de BS e para testes futuros. Uma menor concentração, tanto da fonte de carbono como da fonte de nitrogênio, pode favorecer uma redução de custos do processo produtivo, além do fato de que existem vários relatos na literatura que indicam que uma menor concentração da fonte de N no meio de cultura pode favorecer a produção de BS.

Nos processos fermentativos, a relação C/N afeta o acúmulo de metabólitos. Altas relações C/N (isto é, baixos níveis de nitrogênio) limitam o crescimento bacteriano, favorecendo o metabolismo celular para a produção de metabólitos. Em contraste, o excesso de nitrogênio leva à síntese de material celular e limita o acúmulo de produtos⁷². Em comparação com o amônio, a assimilação de nitrato é mais lenta e simula a limitação de nitrogênio, que é favorável à produção de BS. Em geral, observa-se que concentrações limitantes de nitrogênio favorecem a produção de biossurfactantes por vários microrganismos.

Davis e colaboradores¹¹⁴ observaram que o *Bacillus subtilis* ATCC 21332 aumentou sua produção de biossurfactantes apenas quando o nitrato diminuiu no meio de cultura.

Fonseca e colaboradores¹¹⁵ estudaram uma linhagem de *B. subtilis* que mostrou uma maior redução da tensão superficial em condições C/N menores (3 e 9) e inversamente proporcional à velocidade de agitação utilizada. Uma relação C/N de 15, causou uma ligeira redução no seu desempenho em termos de redução da tensão superficial mesmo com o aumento da taxa de agitação onde o açúcar cristal e o NH₄NO₃ atuaram como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente.

Heryani e Putra¹¹⁶ estudaram o efeito da concentração inicial de glicose e da relação C/N para *Bacillus* sp BMN 14. Foram testadas as relações C/N de 17,51, 12,36 e 10,56 onde concentrações mais altas da fonte de nitrogênio resultaram em maior consumo de glicose, entretanto, a produção ótima de biossurfactante foi obtida na relação C/N de 12,36. Isso implica que a quantidade de nitrogênio consumida nessa proporção foi maior do que a quantidade de carbono consumida em comparação com outras proporções favorecendo a produção de BS pelo isolado BMN 14.

4.4.8 Avaliação da capacidade emulsificante em diferentes substratos orgânicos

O BS produzido na condição do Frasco 7 (descrita no item 4.3.7), na forma de extrato

livre de células, teve sua capacidade emulsificante (E_{24}) testada em treze substratos com diferentes graus de hidrofobicidade (Figura 33).

Figura 33 - Índices de emulsificação (E_{24}) do BS produzido pela linhagem Ar70C2 quando adicionado a diferentes substratos hidrofóbicos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os melhores índices E_{24} quanto à grandeza e densidade da emulsão foram registrados nos seguintes substratos: querosene, com um E_{24} de 60,46 ($\pm 2,68$)%; tolueno, com E_{24} de 69,15($\pm 7,07$)%; dicloroetano, com E_{24} de 73,61 ($\pm 11,54$)% e azeite, com E_{24} de 100 ($\pm 0,00$)% (Figura 34). Outros substratos como diclorometano e clorofórmio também o obtiverem altos índices de emulsificação, porém a densidade da emulsão resultante foi baixa, com a formação de muitas bolhas, o que pode indicar uma menor concentração de BS presente.

Figura 34 - Resultado do teste de emulsificação utilizando-se o azeite como substrato hidrofóbico. Nos tubos a, b e c (tréplicas) observa-se a camada de emulsão formada após a adição de extrato de cultivo de 96 horas livre de células. Nos tubos denominados Controle apenas meio de cultura sem inóculo bacteriano foi adicionado ao azeite, não formando camada de emulsão.

Fonte: Elaborada pela autora

Pathak e Keharia¹¹⁶ avaliaram a ação emulsificante do BS produzido por *Bacillus subtilis* K1 isolado de raízes aéreas da árvore Figueira-de-bengala sobre quatro substratos (hexano, heptano, octano e óleo de motor). O maior E_{24} (%) foi observado em óleo de motor ($93,3 \pm 0,7$) e o menor, em hexano ($33,3 \pm 0,5$), valor esse próximo ao observado em nosso trabalho para hexano ($32,18 \pm 1,16$).

Maia e colaboradores¹¹⁷ investigaram o potencial do *Bacillus subtilis* UCP 0146 na bioconversão do meio contendo 100% de efluente de farinha de mandioca para obtenção de bioemulsificante. A avaliação da produção foi realizada pelo índice de emulsificação (E_{24}) e tensão superficial (TS) com a fase sobrenadante dos cultivos. Os substratos usados para o E_{24} foram: óleo de soja, óleo de milho, óleo de canola, azeite, óleo de soja residual, diesel e óleo de motor queimado. Os melhores resultados de índice de emulsificação foram obtidos para óleo queimado de motor, com o E_{24} de 95% e para azeite com o E_{24} de 90%; este pode ser comparado com o resultado obtido neste trabalho que obteve um E_{24} de 100% ao utilizar o azeite como substrato.

Bacillus tequilensis CH, isolado de um lago de água salobra, teve seu BS caracterizado como um lipopeptídeo e teve seu índice de emulsificação avaliado nos substratos: óleo de coco, querosene, óleo de mostarda, óleo de parafina, gasolina, benzeno e tolueno. Os

melhores resultados ocorreram quando o óleo de coco (E_{24} de 84%) e o querosene (E_{24} de 70%) foram utilizados como substratos.¹¹⁸ Este último resultado é um pouco superior ao que foi obtido neste trabalho, onde o E_{24} obtido com o querosene foi de 60,46 ($\pm 2,68$)%.

O querosene é um substrato bastante utilizado na literatura no que diz respeito à avaliação da capacidade emulsificante de biossurfactantes, por isso, ao utilizá-lo tem-se uma boa base para comparações, além da possibilidade de recuperá-lo após a utilização, via tratamento de resíduos. Por essas razões ele foi escolhido como substrato para os testes de emulsificações realizados ao longo deste projeto. O alto índice de emulsificação atingido com o uso do azeite demonstra possíveis potenciais que podem se ser explorados em relação ao BS do isolado Ar70C2, como ingrediente de formulação na indústria alimentícia e na indústria cosmética, onde pode atuar promovendo a formação e estabilização de emulsões, auxiliando e garantindo que os componentes dos produtos se mantenham solubilizados.

4.4.9 Testes de estabilidade do biossurfactante

A estabilidade da ação do biossurfactante em condições diversas de salinidade, pH e temperatura é uma informação importante para sua utilização (ou do microrganismo que o produz) em MEOR.

De modo geral, o BS preservou sua capacidade emulsificante sem grandes variações frente às condições testadas de salinidade, pH e temperatura, conforme apresentado na Figura 35. Na figura, o controle consiste em uma solução de 0,1% de BS em água, mantido à temperatura ambiente e sem ter tido qualquer tipo de correção em relação ao pH ou salinidade.

Figura 35 - Resultados dos testes de estabilidade do BS, expressos pelo índice E_{24} (%). De cima para baixo, valores registrados de E_{24} em diversas condições de salinidade, pH e temperatura.

Fonte: Elaborada pela autora

Em relação à salinidade, os valores de E_{24} variaram entre 49,44 ($\pm 1,11$)% (9% de NaCl ou 0,9 g/L) e 58,88 ($\pm 1,11$)% (3% de NaCl ou 0,3 g/L); em relação ao pH, variaram entre 51,74 ($\pm 2,01$)% (pH 8) e 59,12($\pm 4,78$)% (pH 7); em relação à temperatura, variaram entre 50,00 ($\pm 5,97$)% (80°C) e 61,29($\pm 3,64$)% (4°C). O Controle apresentado nos três gráficos teve um E_{24} de 59,12 ($\pm 4,78$) %.

Observamos que o BS se mostrou estável frente às diferentes condições de temperatura, pH e salinidade testadas, já que a sua capacidade emulsificante não foi perdida frente às condições extremas de cada parâmetro no qual ele foi submetido. Este resultado indica sua adequabilidade para aplicações em processos de MEOR, já que os reservatórios de óleo são ambientes extremos, muitos com alta salinidade e alta temperatura, e sujeitos a uma ampla faixa de valores de pH.

Zhang e colaboradores¹¹⁹ realizaram um estudo com uma linhagem de *Bacillus atrophaeus* 5-2a, isolada de solo contaminado com óleo, e verificaram a estabilidade do biossurfactante por ela produzido a partir do cultivo em dois meios de culturas distintos, frente a variações de temperatura (20-121°C), pH (2–13) e salinidade (0–50%, p/v). Aquecer os BS (na forma de extratos livres de células) até 121°C não teve efeito significativo sobre suas atividades de emulsificação. Houve desvios mínimos na faixa de pH de 6–13, e as atividades de emulsificação dos BS ficaram estáveis acima de pH 7,0. Maior estabilidade foi observada em condições alcalinas, em comparação com condições ácidas, e o valor mínimo de TS foi obtido em pH 6,0. Sob um pH ácido (pH 2,0 e 5,0) os biossurfactantes mostraram muito menos atividade; e a TS aumentou, devido à precipitação dos biossurfactantes. Estes resultados indicam que o aumento do pH tem um efeito positivo sobre a atividade de superfície e estabilidade dos biossurfactantes. Outros autores confirmaram a estabilidade de biossurfactantes produzidos por linhagens de *Bacillus* em diferentes valores de pH, mas principalmente sob condições alcalinas.^{120,121}

Ainda sobre os resultados alcançados por Zhang e colaboradores¹¹⁹ a atividade de superfície dos BS produzidos em ambos os meios variou com salinidade de 0 a 50% (p/v); quando a salinidade foi inferior a 9%, o índice de emulsificação e a TS dos sobrenadantes livres de células foram constantes. O índice de emulsificação diminuiu e a TS aumentou, com maiores concentrações de sal; no entanto, a atividade permaneceu alta a uma salinidade de 15% (p/v). Mesmo na concentração salina mais alta (50%, p/v), os biossurfactantes produzidos ainda tiveram razoável atividade. No geral, observou-se estabilidade relativamente alta em relação à salinidade.

Barakat e colaboradores¹²² estudaram duas linhagens de *Bacillus*, *B. amyloliquefaciens* SH20 e *B. thuringiensis* SH24, que foram isoladas de amostras de água do mar. A estabilidade dos biossurfactantes foi avaliada em diferentes temperaturas (30, 40, 45, 50, 60 ° C), pHs (5, 6, 7, 9 e 11) e salinidades (determinadas pela adição de diferentes concentrações de NaCl: 0, 3, 5, 10, 15, 20, 25 e 30%). Para determinar a estabilidade, medidas de E₂₄ foram realizadas nos caldos livres de células das culturas após a exposição a cada condição citada. Em relação à salinidade, a atividade de emulsificação para SH24 foi estável (57%) utilizando NaCl a 15%; em seguida, a atividade diminuiu gradualmente com 20-30% de NaCl. A atividade de emulsificação produzida pelo SH20 foi gradualmente aumentada para 60%, com 10 a 15% de NaCl, o aumento foi de 20 a 30%. Em relação à temperatura, a maior atividade de emulsificação de SH24 e SH20 foi observada a 30°C, com índice de emulsificação de 57% e 60% respectivamente; porém o biossurfactante ainda é estável na faixa de 40 a 60°C, indicando que ambos os isolados são termotolerantes. Em relação ao pH, a atividade máxima de emulsificação para SH24 e SH20 ocorreu em valor alcalino (pH 11) atingindo um E₂₄ de 60% e 69%, respectivamente. A atividade de emulsificação diminuiu conforme a diminuição do valor do pH, sendo sugerido que isto pode ser devido à precipitação parcial do biossurfactante.

4.4.10 Medida de Tensão Superficial (TS) e Interfacial (TI)

As medidas de tensão superficial e interfacial foram realizadas pelo método do anel de *Du Nouy*⁶⁶, conforme descrito no item 3.4.1.3, utilizando-se uma solução do BS semi-purificado na concentração de 5ppm, produzido a partir das condições de cultivo otimizadas (40g/L NaCl, 55°C, glicerina e NaNO₃ como fontes de C e N). Para a formação da interface com a solução de BS, utilizou-se o hexadecano como fase leve.

A solução de BS semi-purificado apresentou TS de 67,23 (±0,98) mN/m; como parâmetro de eficiência na redução, utilizou-se a TS da água destilada, que foi de 71,862 (±0,002) mN/m. Nota-se, portanto, uma pequena redução de TS provocada pelo BS. A TI entre a água destilada e o hexadecano e entre a solução de BS semi-purificado e o hexadecano foi de 47,420 (±0,06) mN/m e 43,42 (±0,19) mN/m, respectivamente. Do mesmo modo, a redução da TI provocada pelo BS foi pequena.

O BS pode ter como efeito a redução da tensão superficial e interfacial. A surfactina produzida por *B. subtilis*, quando adicionada na água, pode reduzir sua tensão superficial para 25 mN/m e a tensão interfacial, água/hexadecano para menos de 1 mN/m.⁶⁵

Ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* diminuíram a tensão superficial da água para 26 mN/m e a tensão interfacial da água/hexadecano para valor inferior a 1 mN/m.¹²³

Em geral, os biossurfactantes são mais eficientes que tensoativos químicos e a sua Concentração Micelar Crítica (CMC) é várias vezes inferior, isto é, para uma diminuição máxima da tensão superficial, é necessário menos surfactante.¹

No caso do BS semi-purificado da linhagem Ar70C2 a redução da TS e da TI foi pouco expressiva. Este resultado talvez possa ser explicado pelo fato de o BS ainda não ter passado por um processo de purificação e pela presença de alguma impureza remanescente que possa ter afetado as medidas de tensão superficial e interfacial.

Este BS, mesmo na forma semi-purificada, tem uma capacidade emulsificante expressiva, superior à capacidade de redução de tensão.

Nem todo bom agente emulsificante é um bom agente redutor de tensões e vice-versa. Os biossurfactantes são classificados em dois grupos: de baixo peso molecular e de alto peso molecular. Os de baixo peso molecular, geralmente, são mais eficientes em reduzir tensões interfaciais e superficiais, já os de alto peso molecular são mais efetivos estabilizando emulsões.¹²⁴

4.4.11 Quantificação total de proteínas e de ácidos graxos

A quantificação de proteínas do BS produzido pela linhagem Ar70C2 foi feita a partir de uma solução do BS semi-purificado na concentração de 2mg/ml, e como branco foi utilizada a água destilada.

Uma curva padrão de albumina foi utilizada para relacionar a absorbância lida com a concentração (mg/ml) de proteínas em solução (Figura 36). Essa curva é descrita pela equação Equação 3.

Os resultados das medidas de absorbância da amostra e do branco estão representados na Tabela 16.

Figura 36 - Curva padrão com solução de albumina bovina obtida pelo método BCA para cálculo da quantificação de proteína do biossurfactante.

Fonte: Elaborada pela autora.

$$Abs = -0,16938.x^2 + 1,34584.x + 0,00486$$

Equação 3 - Equação que representa a relação entre a absorbância (Abs) e quantidade x de proteínas presentes na amostra.

Tabela 16 - Resultados das medidas de absorbância a 562 nm do branco e da amostra para a quantificação de proteínas pelo método de BCA.

Absorbância do Branco (562 nm)	Absorbância a amostra (562 nm)
0,132	1,511
0,113	1,465
0,114	1,386
0,111	1,433
0,100	1,462
0,105	1,505
Média: 0,1125(±0,0109)	Média: 1,4603(±0,0466)

Fonte: Elaborada pela autora

A diferença entre média do branco e a média da amostra é de 1,3478 (±0,0575); este valor foi colocado na variável x da equação 2 para se obter o total de proteínas presentes na amostra e, resolvendo-se a equação de segundo grau obteve-se uma porcentagem de proteína presente na amostra de 58,51%.

A quantificação de ácidos graxos do BS semi-purificado foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Os resultados estão apresentados na Figura 37 e na Tabela 17.

Tabela 17 - Compostos preditos pela análise cromatográfica do BS semi-purificado.

Pico	Tempo de retenção (min)	Similaridade com a biblioteca do CG-MS (%)	Substância	Área relativa (%)
1	10.317	95	Levulinato de etila ($\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$)	12.76
2	28.051	90	Tridecanoato de Etila ($\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{O}_2$)	1.01
3	28.831	91	Tetradecanoato de etila ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$)	1.18
4	30.164	93	Pentadecanoato de etilo ($\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$)	20.03
5	30.304		Não identificado	1.16
6	32.160	94	Palmitato de etila ($\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$)	22.09
7	32.857	97	Palmitato de etila ($\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$)	9.03
8	34.064	93	N-heptadecanoato de etila ($\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_2$)	15.02
9	34.212	89	N-heptadecanoato de etila ($\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_2$)	3.30
10	35.962	95	Linoleato de etila ($\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_2$)	4.94
11	36.084	93	Oleato de etila ($\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_2$)	4.23
12	36.565	93	Estearato de etila ($\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}_2$)	1.62
13	38.191		Não identificado	1.20
14	39.955		Não identificado	1.76
15	41.654		Não identificado	0.67

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 37 - Cromatograma total da amostra de BS semi-purificado após etanólise.
Fonte: Elaborada pela autora.

A análise parcial de esterificação da amostra apresentou um total de quinze picos (Figura 37), correspondentes a cadeias de ácidos graxos com C15, C16, C17, C18, C19 e C20, com predominância de C18. Este resultado sugere que a linhagem Ar70C2 pode produzir uma mistura de lipopeptídeos com predominância de cadeia de ácidos graxos. Porém, a presença de seis cadeias (C15-C20) de ácidos graxos não indica necessariamente 5 tipos de lipopeptídeos, já que a amostra não estava purificada e, portanto, pode haver impurezas que contenham ácidos graxos na amostra analisada. Observa-se também que os picos 6-7 e 8-9 correspondem a Palmitato de etila e N-heptadecanoato de etila, respectivamente, e essa igualdade entre os picos indica que provavelmente os compostos são isômeros de cadeia, um saturado e o outro ramificado, por isso aparecem como o mesmo composto.

As moléculas de lipopeptídeos são formadas por dois domínios: um domínio hidrofílico formado por um peptídeo associado a um domínio hidrofóbico lipídico. Os lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* são geralmente classificados em três grupos com base em suas cadeias peptídicas específicas e as estruturas dos ácidos graxos: as famílias surfactina, iturina e fengicina.³⁹ Os compostos de iturina são caracterizados pela presença de um heptapeptídeo cíclico ligado a uma cadeia de ácido graxo β -amino com cadeia carbônica variando de C14-C17. Já as fengicinas apresentam-se como um lipodecapeptídeo com ligação lactona e ácido graxo β -hidróxi com cadeia lipídica variável entre 14 a 18 átomos de carbono. As surfactinas são formadas por heptapeptídeo onde a sequência de aminoácidos está ligada por uma ligação lactônica a uma cadeia de ácido graxo β -hidróxi que pode variar de C12 a C16.¹²⁵ O biossurfactante produzido pela linhagem Ar70C2 apresentou resultados que possibilita sua classificação como um lipopeptídeo, porém serão necessários novos testes utilizando-se a fração purificada do BS que possibilite identificar qual a classe dentro dos lipopeptídeos este biossurfactante pertence e também para propor uma estrutura química.

5 CONCLUSÕES

- O isolado Ar70C2 foi identificado, por meio da técnica do sequenciamento do gene RNAr 16S, como *Bacillus alveayuensis* (similaridade de 99,9%).
- O isolado Ar70C2 produziu um BS que possui propriedades redutoras de tensão e emulsificante, com destaque para esta última, em condições termofílicas e halofílicas. Essas características, juntamente com a boa capacidade emulsificante em diversos substratos orgânicos e estabilidade frente a variações de pH, salinidade e temperatura, sugerem uma potencial aplicação em MEOR.
- As condições de cultivo que proporcionaram uma otimização da produção de BS pelo isolado Ar70C2, com os melhores valores de índice de emulsificação, redução de tensão e massa de BS produzida foram: meio mineral definido com glicerina vegetal e nitrato de sódio como fontes de C e N, respectivamente, salinidade de 35 g/L de NaCl, temperatura de 55°C, sem agitação, com adição de elementos traços (5 ml/L) e com uma relação C/N de 4 (com C = 2g/L e N = 0,5 g/L). O uso de pequena quantidade de fontes de carbono e de nitrogênio bem como de uma fonte de carbono de baixo custo (glicerina) na condição otimizada de produção de BS sinaliza uma economia no custo da sua produção em maior escala.
- O biossurfactante semi-purificado obtido do isolado Ar70C2 apresentou estabilidade na sua ação emulsificante 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 alta temperatura e alta salinidade).

REFERÊNCIAS

- 1 DESAI, D. J.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.
- 2 MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v. 1, n. 5, 2011. doi: 10.1186/2191-0855-1-5
- 3 VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects: part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 6, p. 604–620, 2006.
- 4 HOMMEL, R. K. Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms - biosurfactants in hydrocarbon utilization. **Biodegradation**, v. 1, n. 2–3, p. 107–119, 1990.
- 5 MAIER, R. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, v. 52, p. 101–121, 2003.
- 6 CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS, 4, 2007, Campinas. **Anais[...]** Campinas: Associação Brasileira de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás, 2007. p 2.1.72 – 1-9
- 7 SALIHU, A.; ABDULKADIR, I.; ALMUSTAPHA, M. N. An investigation for potential development on biosurfactants. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 3, n. 5, p. 111–117, 2009.
- 8 MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 37–42, 1997.
- 9 DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 1015–1019, 2009.
- 10 DE, S.; MALIK S.; GHOSH A.; SAHA R.; SAHA B. A review on natural surfactants. **RSC Advances**, v. 5, n. 81, p. 65757–65767, 2015.
- 11 ZINJARDE, S. S.; PANT, A. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. **Journal of Basic Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 67–73, 2002.
- 12 ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 4, p. 313–316, 2000.
- 13 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.

- 14 GUERRA-SANTOS, L. H.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 443–448, 1986.
- 15 GUERRA-SANTOS, L.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 301–5, 1984.
- 16 HOMMEL, R.; STÜWER O.; STUBER, W.; HAFERBURG D.; KLEBER H. P. Production of water-soluble surface-active exolipids by *Torulopsis apicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 199–205, 1987.
- 17 GHRIBI, D.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S. Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1–6, 2011. doi: 10.4061/2011/653654.
- 18 BASHEER, S. M.; CHELLAPPAN, S.; BEENA, P. S.; SUKUMARAN, R. K.; ELYAS, K. K.; CHANDRASEKARAN, M. Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: production, partial purification and application in oil effluent treatment. **New Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 627–638, 2011.
- 19 KUMAR, P. N.; SWAPNA, T. H.; KHAN, M. Y.; REDDY, G.; HAMEEDA, B. Statistical optimization of antifungal iturin A production from *Bacillus amyloliquefaciens* RHNK22 using agro-industrial wastes. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 7, p. 1722–1740, 2017.
- 20 MAKAR, R. S.; ROCKNE, K. J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 2280–2292, 2003.
- 21 MUKHERJEE, A. K. Potential application of cyclic lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains in laundry detergent formulations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 330–335, 2007.
- 22 DAS, K.; MUKHERJEE, A. K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 7, p. 1339–1345, 2007.
- 23 MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183–198, 2005.
- 24 BANAT, I. M.; MAKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495–508, 2000.
- 25 BANAT, I. M.; MAKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactants: properties, commercial production and application. **Current Science**, v. 94, n. 6, p. 736–774, 2008.

- 26 GHARAEI, E. Biosurfactants in pharmaceutical industry (a mini-review). **American Journal of Drug Discovery and Development**, v.1, n. 1, p. 58-69, 2011.
- 27 LAZAR, I.; PETRISOR, I. G.; YEN, T. F. Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR), **Petroleum Science and Technology**, v. 25, n.11, p. 1353-1366, 2007.
- 28 OLLIVIER, B.; MAGOT, B. **Petroleum microbiology**. Washington, D.C.: ASM Press, 2005.
- 29 MAUDGALYA, S.; KNAPP, R. M.; MCINERNEY, M. J. Microbial enhanced-oil-recovery technologies: a review of the past, present, and future. *In*: SPE PRODUCTION AND OPERATIONS SYMPOSIUM, 2007, Oklahoma, USA. **Proceedings [...]**. Texas: SPE,2007. doi:10.2118/106978-MS.
- 30 BELYAEV, S. S.; BORZENKOV, I. A.; NAZINA, T. N.; ROZANOVA, E. P.; GLUMOV, I. F.; IBATULLIN, R. R.; IVANOV, M. V. Use of microorganisms in the biotechnology for the enhancement of oil recovery. **Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 590–598, 2004.
- 31 VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 503–549, 2003.
- 32 SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: the microbial EOR. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 3, n. 34, p. 714-724, 2008.
- 33 BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, v. 51, n. 1, p. 1–12, 1995.
- 34 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.
- 35 MOSES, V. Microbes and oil recovery. **Microbiological Sciences**, v. 4, n. 10, p. 306-309, 1987.
- 36 VAN DYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Applications of microbial surfactants. **Biotechnology Advances**, v. 9, n. 2, p. 241–252, 1991.
- 37 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, p. 917-925, 2008. doi: 10.1007/s11274-007-9609-y
- 38 CHRISTOVA, N.; TUVELA, B.; NIKOLOVA-DAMYANOVA, B. Enhanced hydrocarbon biodegradation by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. **Zeitschrift fur Naturforschung C: a journal of biosciences**, v. 59, n. 3-4, p. 205-208, 2004.
- 39 ZHAO, H.; SHAO, D.; JIANG, C.; SHI, J.; LI, Q.; HUANG, Q.; RAJOKA, M. S. R.; YANG, H.; JIN, M. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 15, p. 5951–5960, 2017.

- 40 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.
- 41 BESSON, F.; MICHEL, G. Isolation and characterization of new iturins: iturin D and iturin E. **Journal of Antibiotics**, v. 40, n. 4, p. 437–42, 1987.
- 42 MAGET-DANA, R.; PEYPOUX, F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. **Toxicology**, v. 87, n. 1–3, p. 151–174, 1994.
- 43 PARK, S. Y.; KIM, J. H.; LEE, Y. J.; LEE, S. J.; KIM, Y. Surfactin suppresses TPA-induced breast cancer cell invasion through the inhibition of MMP-9 expression. **International Journal of Oncology**, v. 42, n. 1, p. 287–296, 2013.
- 44 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. 479–489, 2005.
- 45 JOSHI, S. J.; GEETHA, S. J.; DESAI, A. J. Characterization and application of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* R2. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 177, n. 2, p. 346–361, 2015.
- 46 MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Effects of various nutritional supplements on biosurfactant production by a strain of *Bacillus subtilis* at 45 °C. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 5, p. 11–17, 2002. doi: 10.1007/s11743-002-0199-8
- 47 ARGENTIN, M. N. **Produção de biossurfactante por uma linhagem termofílica de *Bacillus* isolada de amostra rochosa de reservatório de petróleo**. 2016. 123 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, **2016**.
- 48 MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 509–515, 2006
- 49 MAKKAR, R.; CAMEOTRA, 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.
- 50 BANAT, I. M.; SUREKHA K. S.; CAMEOTRA, S. S.; PATIL R.; NYAYANIT, N. V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–18, 2014. doi:10.3389/fmicb.2014.00697.
- 51 JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; JHA, S.; YADAV, S.; NERURKAR, A.; DESAI A. J. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 195–199, 2008.
- 52 AL-BAHRY, S. N.; AL-WAHAIBI, Y. M.; ELSHAFIE, A. E.; AL-BEMANI, A. S.; JOSHI, S. J.; AL-MAKHMARI, H. S.; AL-SULAIMANI, H. S. Biosurfactant production by

Bacillus subtilis B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 81, p. 141–146, 2013. doi: 10.1016/j.ibiod.2012.01.006

53 DE FARIA, A. F.; STÉFANI, D.; VAZ, G. B.; SILVA, I. S.; GARCIA, S. J.; EBERLIN, M., N.; GROSSMAN, M. J.; ALVEZ, L. O.; DURRANT, L. R. Purification and structural characterization of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis* LSFM-05 grown on raw glycerol. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 863–871, 2011.

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

55 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.

56 RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N.; KROPPESTEDT, R. M.; STACKEDRANDT, E. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. **Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 4, p. 1088–1092, 1996.

57 KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

58 ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAEFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.

59 KIM, O. S.; CHO, Y. J.; LEE, K.; YOON, S. H.; KIM, M.; NA, H.; PARK, S. C.; JEON, Y. S.; LEE, J. H.; YI, HANA; WON, S.; CHUN, J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 716–721, 2012.

60 MYERS, E. W.; MILLER, W. Optimal alignments in linear space. **Bioinformatics**, v. 4, n. 1, p. 11–17, 1988.

61 ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search. **Journal Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.

62 MAIDAK, B. L.; COLE, J. R.; PARKER, C. T. ; GARRITY, G. M.; LARSEN, N.; LI, B.; LILBURN, T. G.; MCCAUGHEY, M. J.; OLSEN, G. J.; OVERBEEK, R.; PRAMANIK, S.; SHIMIDT, T. M.; TIEDJE, J. M.; WOESE, C. R. A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 1, p. 171–173, 1999.

63 NOGUEIRA, J. M. R.; MIGUEL, L. F. S. Bacteriologia. In: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, 2013. p. 221–397. Disponível

em: <http://www.epsjv.fiocruz.br/publicacao/livro/conceitos-e-metodos-para-formacao-de-profissionais-em-laboratorios-de-saude-volum-0>. Acesso em: 15 jan. 2020.

64 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.

65 COOPER, D.; MACDONALD, C.; DUFF, S.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 408–412, 1981.

66 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.

67 CAYMAN CHEMICAL. **Protein determination BCA kit**. Disponível em: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf. Acesso em: 16/01/2019.

68 CHRISTIE, W. W. Gas chromatography-mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. **Lipids**, v. 33, n. 4, p. 343–353, 1998.

69 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.

70 SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 6, p. 718–725, 2005.

71 MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 12th ed. São Paulo: Prentice Hall, 2010

72 ROBERT, M.; MERCADÉ, M. E.; BOSCH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPINY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 12, p. 871–874, 1989

73 FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Biotechnology**, v. 10, n. C, p. 208–217, 1992.

74 WHAT are response surface designs, central composite designs, and Box-Behnken designs? Disponível em: <https://support.minitab.com/en-us/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/supporting-topics/response-surface-designs/response-surface-central-composite-and-box-behnken-designs/>. Acesso em: 11 set. 2018.

- 75 ADINARAYANA, K.; ELLAIAH, P. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 3, p. 272–278, 2002.
- 76 PARK, Y.; KANG, S.; LEE, J.; HONG, S.; KIM, S. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 6, p. 761–766, 2002.
- 77 PURI, S.; BEG, Q. K.; GUPTA, R. Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. **Current Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 286–290, 2002.
- 78 HUJANEN, M.; LINKO, S.; LINKO, Y.Y.; LEISOLA, M. Optimization of media and cultivation conditions for L(+)(S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-44. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 1–2, p. 126–130, 2001.
- 79 SADHUKHAN, A. K. et al. Optimization of mycophenolic acid production in solid state fermentation using response surface methodology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33–38, 1999.
- 80 SUNITHA, I.; SUBBA RAO, M. V.; AYYANNA, C. Optimization of medium constituents and fermentation conditions for the production of L-glutamic acid by the coimmobilized whole cells of *Micrococcus glutamicus* and *Pseudomonas reptilivora*. **Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 5, p. 353–359, 1998.
- 81 ZHANG, J.; MARTIN, C.; SHIFFET, M. A.; SALMON, P.; BRIX, T.; GREASHAM, R.; BUCKLAND, B. CHARTRAIN, M. Development of a defined medium fermentation process for physostigmine production by *Streptomyces griseofuscus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 5, p. 568–575, 1996.
- 82 IBRAHIM, H. M.; ELKHIDIR, E. E. Response surface method as an efficient tool for medium optimisation. **Trends in Applied Sciences Research**, v. 6, n. 2, p. 121–129, 2011.
- 83 TABARI, K.; TABARI, M. Characterization of a biodegrading bacterium, *Bacillus subtilis*, isolated from oil-contaminated soil. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 14, n. 12, p. 2583–2590, 2017.
- 84 BAE, S.; LEE, J.; KIM, S. *Bacillus alveayuensis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from deep-sea sediments of the Ayu Trough. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 1211–1215, 2005.
- 85 GUGLIANDOLO, C.; MAUGERI, T. L.; CACCAMO, D.; STACKEBRANDT, E. *Bacillus aeolius* sp. nov. a novel thermophilic, halophilic marine *Bacillus* species from Eolian Islands (Italy). **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 172–176, 2003.
- 86 ARFMAN, N.; DIJKHUIZEN, L.; KIRCHHOF, G.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. -H.; BULYGINA, E. S.; CHUMAKOV, K. M.; GOVORUKHINA, N. I.; TROTSSENKO, Y. A.; WHITE, D.; SHARP, R. J. *Bacillus methanolicus* sp. nov., a new species of thermotolerant, methanol-utilizing, endospore-forming bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 3, p. 439–444, 1992.

- 87 AL-AWADHI N.; EGLI, T.; HAMER, G.; WEHRLI, E. Thermotolerant and thermophilic solvent-utilizing methylotrophic, aerobic bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 207-216, 1989.
- 88 SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.
- 89 STUDIER, J.A.; KEPPLER, K. J. A note on the neighbor-joining algorithm of Saitou and Nei. **Molecular Biology and Evolution**, v. 5, n. 6, p. 729-731, 1988.
- 90 HOLDER, M.; LEWIS, P. O. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. **Nature**, v. 4, n. 4, p. 275-284, 1994.
- 91 HILLIS, D. M.; BULL, J. J. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. **Systematic Biology**, v. 42, n. 2, p. 182-192, 1993.
- 92 ZHARKIKH, A.; LI, W.-H. Statistical properties of bootstrap estimation of phylogenetic variability from nucleotide sequences. I. four taxa with a molecular clock. **Journal of Molecular Evolution**, v. 9, n. 6, p. 1119-1147, 1992.
- 93 DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.-H.;
STACKEBRANDT, E. **The prokaryotes**. 3rd ed. New York: Springer Verlag, 2006. v. 4
- 94 API®50 CHL médium. bioMérieux SA, 2011. Disponível em:
https://www.mediray.co.nz/media/15797/om_biomerieux_test-kits_ot-50410_package_insert-50410.pdf. Acesso em 23 mar. 2019.
- 95 ARUWA, C.; OLATOPE, S. Characterization of bacillus species from convenience foods with conventional and api kit method: a comparative analysis. **Journal of Applied Life Sciences International**, v. 3, n. 1, p. 42-48, 2015.
- 96 NAGWA, M.; HADRY, A.; EMAN, A. Biosurfactant production by *bacillus cereus* b 7 from lubricant oil waste. **International Journal of Science and Research**, v. 3, n. 12, p. 498-509, 2014.
- 97 ABUSHADY, H. M.; BASHANDY, A. S.; AZIZ, M. H.; IBRAHIM, H. M. M. Molecular characterization of *bacillus subtilis* surfactin producing strain and the factors affecting its production. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 7, n. 3, p. 337-344, 2005.
- 98 MAKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two Bacillus strains at thermophilic conditions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 7, p. 887-889, 1997.
- 99 UPDEGRAFF, D. M. Early research on microbial enhanced oil recovery. **Developments in Industrial Microbiology**, v. 31, p. 135-142, 1990.
- 100 JOSHI, S. J.; AL-WAHAIBI, Y. M.; AL-BAHRY, S. N.; ELSHAFIE, A. E.; AL-BEMANI, A. S.; AL-BAHRI, A.; AL-MANDHARI, M. S. Production, characterization, and

application of *Bacillus licheniformis* W16 biosurfactant in enhancing oil recovery. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 1–14, 2016.

101 SOUSA, J. R.; CORREIA, J. A. C.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B.; CRUZ, A. J. G. Cinética e caracterização de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 utilizando glicerol como fonte de carbono. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 431–441, 2014.

102 DE FARIA, A. F.; TEODORO-MARTINEZ, D. S.; DE OLIVEIRA BARBOSA, G. N.; VAZ, B. G.; GARCIA, I. S. S. J. S.; TÓTOLA, M. R.; EBERLIN, M. N.; ALVEZ, M. 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.

103 NITSCHKE, M.; SIDDHARTHA, G. A. O.; CONTIERO, J. Ramnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. **Biotechnololy Progress**, v. 21, p. 1593–1600, 2005. doi: 10.1021/bp050239p

104 MORITA, T.; KONISHI, M.; FUKUOKA, T.; IMURA, T., KITAMOTO, D. Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317T. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 104, n. 1, p. 78–81, 2007.

105 ROONEY, A. P.; PRICE, N. P.; RAY, K. J.; KUO, T. M. Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. **FEMS Microbiology Letters**, v. 295, n. 1, p. 82–87, 2009.

106 DA SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 30–39, 2009.

107 STUDHOLME, D. J.; JACKSON R. A.; LEAK, D. J. Phylogenetic analysis of transformable strains of thermophilic *Bacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 172, n. 1, p. 85–90, 1999.

108 PAKPITCHAROENA, A.; POTIVEJKULB, K.; KANJANAVASA, P.; AREEKITA, S.; CHANSIRIA, K. Biodiversity of thermotolerant *Bacillus* sp. producing biosurfactants, biocatalysts, and antimicrobial agents. **ScienceAsia**, v. 34, n. 4, p. 424–431, 2008.

109 MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 48–52, 1998.

110 GUDIÑA, E. J.; FERNANDES, E. C.; RODRIGUES, A. I.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 59, p. 1–7, 2015.

111 ABDEL-MAWGOUD, A. M.; ABOULWABA, M. M.; HASSOUNA, N. A. H. Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 150, n. 3, p. 305–325, 2008.

- 112 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.
- 113 NURFARAHIN, A. H.; MOHAMED, M. S.; PHANG, L. Y. Culture medium development for microbial-derived surfactants production - an overview. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1–26, 2018.
- 114 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, p. 322–329, 1999. doi: 10.1016/S0141-0229(99)00048-4
- 115 FONSECA, R. R.; SILVA, A. J. R.; DE FRANCA, F. P.; CARDOSO, V. L.; SERVULO, E. F. C. Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137–140, p. 471–486, 2007. doi: 10.1007/s12010-007-9073-z
- 116 HERYANI, H.; PUTRA, M. D. Kinetic study and modeling of biosurfactant production using *Bacillus* sp. **Electron Journal Biotechnology**, v. 27, p. 49–54, 2017. doi: 10.1016/j.ejbt.2017.03.005
- 117 MAIA, P. C.; SANTOS, V. P.; FERREIRA, A. S.; LUNA, M. A.; SILVA, T. A. L.; ANDRADE, R. F. S.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. An efficient producing-bioemulsifier by *bacillus subtilis* ucp 0146 isolated from mangrove sediments. **Colloids Interfaces**, v. 2, n. 4, p. 58, 2018. doi: 10.3390/colloids2040058.
- 118 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.
- 119 ZHANG, J.; XUE, Q.; GAO, H.; LAI, H.; WANG, P. Production of lipopeptide biosurfactants by *Bacillus atrophaeus* 5-2a and their potential use in microbial enhanced oil recovery. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2016.
- 120 BEZZA, F. A.; CHIRWA, E. M. N. Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. **Biochemical Engineering Journal**, v. 101, p. 168–178, 2015.
- 121 AL-WAHAIBI, Y.; JOSHIB, S.; AL-BAHRY, S.; ELSHAFIE, A.; AL-BEMANIA, A.; SHIBULAL, B. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v.114, p.324 - 33, 2014 doi:10.1016/j.colsurfb.201309022.
- 122 BARAKAT, K. M.; HASSAN, S. W. M.; DARWESH, O. M. Biosurfactant production by haloalkaliphilic *Bacillus* strains isolated from Red Sea, Egypt. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 43, n. 3, p. 205–211, 2017.

123 SYLDATK, C.; LANG, S.; WAGNER, F.; WRAY, V.; WITTE, L. Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas spec.* DSM 2874 grown on n-alkanes. **Zeitschrift Naturforschung C**, v. 40, n. 1-2, p. 51-60, 1985.

124 ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 154–162. 1999.

125 BONMATIN, J. -M.; LAPRÉVOTE, O.; PEYPOUX, F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. activity-structure relationships to design new bioactive agents. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 6, n. 6, p. 541-556, 2003.

APÊNDICE A – Análises estatísticas referentes ao item 4.4.5 Influência da solução de elementos-traço

Resultados das análises estatísticas realizadas com os resultados de DO (esquerda) e E₂₄ (direita). Em ambos os casos Com e Sem significam com adição e sem adição de solução-traço.

APÊNDICE B – Análise estatística para a glicose e as fontes de N testadas (item 4.4.6)

Resultado da análise estatística comparativa dos índices de emulsificação E₂₄ registrados nos cultivos em Meio Mineral tendo a glicose como fonte de carbono e alternando-se as três fontes de nitrogênio em estudo.

APÊNDICE C – Análise estatística para a melaço e as fontes de N testadas (item 4.4.6)

Resultado da análise estatística comparativa dos índices de emulsificação E_{24} registrados nos cultivos em Meio Mineral tendo o melaço como fonte de carbono e alternando-se as três fontes de nitrogênio em estudo.

APÊNDICE D – Análise estatística para a glicerina e as fontes de N testadas (item 4.4.6)

Resultado da análise estatística comparativa dos índices de emulsificação E_{24} registrados nos cultivos em Meio Mineral tendo a glicerina vegetal como fonte de carbono e alternando-se as três fontes de nitrogênio em estudo.

APÊNDICE E – Análise estatística para o tempo de cultivo (referente ao item 4.4.6)

Análise estatística comparativa dos índices de emulsificação registrados em todos os experimentos, levando em consideração os tempos de cultivo (em horas).

APÊNDICE F – Análise estatística referente ao item 4.4.7 Otimização da relação carbono/nitrogênio (C/N)

Resultados do teste de Tukey analisando a equivalência dos frascos com diferentes relações C/N em relação (a) aos resultados de E₂₄, (b) aos resultados de tensão superficial (TS, em mN/m) e (c) aos resultados de massa seca (g) do BS produzido nos cultivos da segunda etapa de otimização da relação C/N.

ANEXO A - Sherlock Microbial Identification System

Análise de ésteres metílicos de ácidos graxos celulares (abreviado como FAME, do inglês *fatty acid methyl ester*) feita utilizando-se o Sherlock Microbial Identification System.

DSMZ Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures

HOME ABOUT US RESEARCH BACTERIAL DIVERSITY CATALOGUES DEPOSIT **SERVICES** SHOP SUPPORT CONTACT FAQ

Website Search
to product search »

Services Human and Animal Cell Lines
Services Microorganisms
Identification
Bacterial Genomic DNA
Contact Partner
How to order these services
Prices
Conditions
Services Plant Viruses

Mitglied der

Services > Services Microorganisms > Identification > Analysis of cellular fatty acids

Analysis of cellular fatty acids

For the analysis of the cellular fatty acids an active growing culture or 30 mg freeze dried cells is required.

This analysis is performed by using the Sherlock MIS (MIDI Inc, Newark, USA) system.

Method

Extraction and analysis of fatty acids. Fatty acid methyl esters are obtained from 40 mg cells scraped from Petri dishes by saponification, methylation and extraction using minor modifications of the method of Miller (1982) and Kuykendall et al., (1988). The fatty acid methyl esters mixtures are separated using Sherlock Microbial Identification System (MIS) (MIDI, Microbial ID, Newark, DE 10711 U.S.A.) which consisted of an Agilent model 6890N gas chromatograph fitted with a 5% phenyl-methyl silicone capillary column (0.2 mm x 25 m), a flame ionization detector, Agilent model 7683A automatic sampler, and a HP-computer with MIDI data base (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, California, U.S.A.). Peaks are automatically integrated and fatty acid names and percentages calculated by the MIS Standard Software (Microbial ID). The gas chromatographic parameters are as follows: carrier gas, ultra-high-purity hydrogen; column head pressure 80kPa; injection volume 2 µl; column split ratio, 100:1; septum purge 5 ml/min; column temperature, 170 to 270°C at 5°C/min; injection port temperature, 240°C; and detector temperature, 300°C.

References

- Kämpfer, P. & Kroppenstedt, R. M. (1996). Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Canadian J Microbiology* 42:999-1005.
- Kuykendall, L.D., Roy, M.A., O'Neill, J.J., Devine, T.E. 1988. Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38:358-361.
- Miller, L.T. 1982. A single derivatization method for bacterial fatty acid methyl esters including hydroxy acids. *Journal of Clinical Microbiology* 16:584-586.