

**ISABELLA CAMPELO VILARDI ARGENTINO**

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS TERMOFÍLICAS  
DA ANTÁRTICA PRODUTORAS DE  
BIOSSURFACTANTE**



**Monografia apresentada ao Instituto de  
Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade  
Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito  
para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO**

**DEZEMBRO/2017**

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Prof. Dr. Alexandre Soares Rosado e coorientação da MSc. Júnia Schultz.**

C686b Campelo Vilardi Argentino, Isabella  
Bioprospecção de bactérias termofilicas da  
Antártica produtoras de biossurfactante / Isabella  
Campelo Vilardi Argentino. -- Rio de Janeiro, 2017.  
56 f.

Orientador: Alexandre Soares Rosado.  
Coorientadora: Júnia Schultz.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2017.

1. Ilha Deception. 2. Vulcão polar. 3.  
Termofílicos. 4. Produção de biossurfactante. 5.  
Biorremediação. I. Soares Rosado, Alexandre, orient.  
II. Schultz, Júnia, coorient. III. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

ISABELLA CAMPELO VILARDI ARGENTINO

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS TERMOFÍLICAS DA ANTÁRTICA PRODUTORAS  
DE BIODISSURFACTANTE

Rio de Janeiro, 07 de dezembro de 2017

---

(Prof. Dr. Diogo de Azevedo Jurelevicius – IMPG)

---

(Prof. Dr. Angelo Samir Melim Miguel – Farmácia)

---

(Dra. Camila Rattes de Almeida Couto – IMPG)

---

(Prof. Dr. Ana Maria Mazotto – IMPG)

**À minha avó, Gioconda (*in memoriam*), que mesmo sem entender o que eu fazia sempre me apoiou e ficou tão feliz quanto eu quando recebi a notícia da aprovação no curso. Consegui, vó!**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus e a todos os meus amigos espirituais, que sempre estiveram tão perto de mim, tão dentro do meu coração. Obrigada por me compreenderem tão bem e por me oferecerem conforto em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis. Sem essa força e luz eu não teria conseguido.

À minha família que, mesmo sem conseguir entender muitas das coisas que precisamos passar nessa graduação, estiveram sempre ao meu lado, me apoiando em todas as decisões e me dando muita força. Obrigada por entenderem os meus momentos de ausência e meus momentos de respostas mais cansadas e estressadas. Obrigada, mãe, por se preocupar com minhas horas de sono e com o horário que saio do Fundão, por me dar sempre aquele colo que me dá tanta segurança e pelos conselhos de mandar tudo ir à merda. Obrigada, pai, por sempre achar tudo que eu faço o máximo e por me fazer mais forte e confiante com isso, por dizer sempre que tudo vai ficar bem, por me ver sair de casa todos os dias e me levar até a porta, e por perguntar como foi o dia pra eu responder “legal!”. Obrigada, tiaaaaa, por ser sempre tão presente mesmo não nos vendo todos os dias, obrigada por sempre mandar mensagens e por sempre acertar quando eu mais preciso de uma. Obrigada por amar meu curso tanto quanto eu e por me dar tanto apoio e força. Sempre. Obrigada, din, por ser sempre tão carinhosa comigo, por se interessar e querer saber sempre como estão as coisas, por me dar sempre conselhos tão bons, por sempre estar do meu lado e disposta a ajudar. Obrigada por todo o esforço que fazem por mim. Obrigada por sempre acreditarem em mim e por não me deixarem desistir. Obrigada por acharem o máximo o que eu faço e por me darem toda a força. Eu juro que não saberia o que seria de mim sem vocês. Eu amo vocês um tantão!

Aos meus amigos fora da faculdade que, mesmo distantes, estão sempre perto. Luiza e Pedro, vocês são essenciais na minha vida. Louiza, obrigada por me aguentar desde a quinta série! Por compartilhar tantos momentos comigo e por me ensinar tanta coisa que passa por essa cabeça doida que adoro. Perdoa sua amiga ausente nesses últimos anos, mas que não deixa de pensar em você em nenhum momento. Obrigada por tudo! Marcelina, imensa! Que bom ter um amigo como você na minha vida! Agradeço por todos os momentos de vôlei, gordices, conselhos e broncas. Obrigada por sempre estar disposto a conversar e saber como estou. Perdoa também meus momentos de ausência. Obrigada por serem meus amigos e estarem comigo até hoje. Eu não teria conseguido sem vocês. Amo muito!

Um brinde à Microvariância! O que teria sido a minha graduação sem vocês? Não gosto nem de imaginar. As pessoas mais improváveis se juntaram e que resultado delicioso que deu! Miga, Lari, hermana, Thi, migo, Julien e Ivoneide, obrigada por fazerem meus dias mais leves, obrigada por compartilharem tantos sentimentos e tantos momentos, e por me fazerem sentir sempre muito bem amparada. Obrigada por me darem a certeza de uma amizade verdadeira e por sempre saber pra onde correr quando algo “dava ruim”, ou quando algo “dava muito bom”. Agradeço por estarem sempre presentes. Sempre mesmo. Obrigada por aguentarem meu jeito um pouco sensível de ser. Vocês são verdadeiros guerreiros! Somos um cachorro do outro sim e eu me orgulho disso! Amo muito vocês e agradeço todos os dias por vocês, seres iluminados, terem caído do céu de presente pra mim.

À todos os meus companheiros de turma, por todos os momentos engraçados e de desespero, pelas confraternizações e por toda ajuda durante a graduação. Vocês, com certeza, são a melhor turma! Agradeço em especial a Dede, pelas placas de agar sangue! Obrigada por ser essa coisa linda, divertida e carinhosa (comigo hehe); a Gi, com esse coração enorme e lindo! Obrigada por todo o carinho de sempre e por ter sido tão forte em aguentar BM e Imunopatologia duas vezes comigo; Renatinho por ser esse ser fofo, espontâneo e por conseguir me fazer dar muitas risadas, obrigada pela ótima companhia sempre; à Veve, por ser minha mãe na faculdade, por ter esse coração enorme, e um abraço gostoso e reconfortante. Obrigada por tudo; ao Vini que sempre me tratou muito bem, que é sempre ótima companhia e que consegue arrancar muitas risadas minhas. Torço muito pelo sucesso de vocês!

Ao meu super companheiro, Wes, por tudo. Agradeço por ter entrado na minha vida de maneira tão especial, e por ter escolhido permanecer. Obrigada por dividir seus dias comigo e por me deixar fazer parte deles. Obrigada por compartilhar comigo todos os momentos alegres e os não tão alegres, por ser meu porto seguro e meu mar calmo. Por estar sempre presente fazendo a diferença nos meus dias. Por conseguir me mostrar que para tudo tem solução e que sim, eu posso parar de pensar por um instante. Obrigada por ter esse poder. Agradeço todo o apoio que você me dá em tudo que me proponho a fazer, e por me fazer acreditar quando acho que não vou conseguir. Entendo que alguns puxões de orelha são necessários e agradeço por eles. Obrigada por não desistir de mim e por me fazer crescer cada dia mais. Te amo muito.

Pessoal lindo, especial e muito divertido que tive a sorte de conhecer! Galera do MM07 e BMM14! Bia, Gabi Mastrobuono, Gabi Puccinelli, Bruno e Jey! Obrigada por me cederem o espaço de vocês para eu escrever e fazer umas bagunças! Sempre fui muito bem recebida! Vocês são demais! Agradeço em especial à Amandinha e à Su, por serem pessoas maravilhosas, carinhosas e por me tratarem tão bem. Obrigada pelas conversas e pela força de sempre. Tenho um carinho muito especial por vocês. Vocês são duas lindas, e eu adoro demais!

Ao Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM), que foi o primeiro laboratório que me acolheu e me ensinou muita coisa. Galera especial que vou levar sempre comigo e perturbarei sempre que possível: Livia, Lara, Stella, Rapha, Gabi e Larissa. Obrigada por serem sempre uns fofos e pessoas divertidíssimas! Adoro vocês! Em especial à professora Raquel Bonelli, por ter me aceito e me orientado tão bem no tempo que estive lá. Obrigada pela confiança e pelos ensinamentos. À Késia, coisa mais linda desse mundo! Você é a melhor de todas, não canso de dizer! Obrigada por ter sido uma co-orientadora espetacular e por ter me ensinado tanta coisa. Obrigada pela paciência, pelas tortinhas de limão quando estava triste, pelas conversas no fluxo enquanto fazíamos antibiograma e por todas as gonos que a gente colocava pra crescer de novo e de novo! “Vamos, timeeeee!” Obrigada pela confiança também. Torço muito por você, e saiba que uma das partes mais difíceis de deixar o LIMM foi porque não ia mais ter sua companhia todos os dias! Ao professor Sergio Fracalanza, que se tornou um amigo. Você é muito especial para mim e vou te levar sempre no coração. Muito obrigada por tudo! Por sempre abrir sua sala para a gente conversar, por sempre estar disposto a perguntar como estão as minhas coisas e por realmente se importar. Muito obrigada por todos os conselhos valiosos e por sempre me receber tão bem quando vou visita-lo no laboratório. Ao Marquinho, pessoa show de bola, que adora minhas visitas porque sempre deixo a cadeira de uma maneira que ele adora! Obrigada por ser sempre tão carinhoso e por estar sempre ali quando precisava. Obrigada pelas nossas conversas e desabafos. Você é demais! Não poderia esquecer da Jupiiiiii! Doidinha, mas com um coração

enorme! Obrigada por todo o café, todas as dicas de cabelo e todos os abraços carinhosos de bom dia! Obrigada por não ter esquecido meu nome até hoje!

Ao pessoal do Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular (LEMM), por ter me recebido com tanto carinho quando eu tanto precisei. Um cheiro especial para Deborinha, esse doce de pessoa sempre disposta a ajudar, e para Carolzinha com seu coração lindo e enorme! Meninas batalhadoras, tenho um carinho muito grande por vocês. Obrigada pelas conversas, conselhos e risadas. Roberto (Beto, me arremessa!) ah, Roberto... aquela pausa dramática porque é só assim que a gente se entende. Que presente eu ganhei! Nunca imaginaria que teríamos essa amizade tão gostosa e tão... nossa. Não consigo descrever nosso jeitinho especial e que amo tanto. Só tenho a agradecer por você estar na minha vida, por ter essa luz que ilumina todos os cantos, e por conseguir captar, em fotografias, meus melhores momentos. Obrigada por compartilhar comigo momentos engraçadíssimos e desesperadores. Migo tá RUIM. Migo, tinhamuuuuu! Agradeço em especial ao professor Alexandre Rosado por ter me aceito nessa equipe maravilhosa, por ter aceitado me orientar mesmo de longe, pelos conselhos, conversas, pela troca de conhecimento, e pelas risadas também! Um super agradecimento mesmo, mesmo, mesmo à Jú! O que teria sido de mim sem você do meu lado? Obrigada por ser essa co-orientadora maravilhosa! Obrigada por ter sido sempre tão presente, por responder minhas dúvidas enquanto patinava em Nova York, por não me deixar faltar nada. Obrigada pelo apoio, pelas conversas e pelos inúmeros momentos de risadas que compartilhamos, além de muito conhecimento. Obrigada por toda paciência que você teve comigo desde o primeiro até o último dia, sempre tão solícita. Isso faz toda a diferença. Você é demais e eu tirei a sorte grande de você me co-orientar. E também quero agradecer por nossa relação ser pautada em comidas e abraço! Melhor relação!

À todos os amigos que a UFRJ me deu: Mell, tão linda, fofa, cheirosa e divertida, obrigada por todos os momentos compartilhados e por todo carinho de sempre! Te adoro; Jean, Bruno e Yas! Esse “trio parada dura” que chegou pra somar muito na minha vida. E a Aline também! Obrigada por todos os momentos, todas as experiências compartilhadas, por todas as maluquices, e por todo carinho; Ísis! Coisa mais linda e fofa! Seja forte. Obrigada pelo carinho de sempre e por sempre falar comigo com um sorrisão estampado no rosto; meus calouros queridos, lindos e uns xuxus: Julia, Victoria, Matheus, Carol e Amanda, vocês são umas figuras e eu não poderia ter tido calouros melhores. Adoro vocês; André! Que é muito mais do que “o moço da secretaria”. Obrigada sempre pela atenção que teve comigo, pelas risadas e desesperos na secretaria e no corredor, pelos cafezinhos antes de começar o dia de trabalho, e por toda ajuda. “André, me ajudaaaaa!”. Sem você, eu não teria conseguido me formar.

Agradeço a quase todos os professores pelas aulas dadas. Obrigada somente àqueles que amam a sua profissão e a exercem com prazer, que pensam nos alunos e que tentam fazer sempre o melhor possível. Em especial àqueles dispostos a ajudar mesmo fora das salas de aula.

Agradeço às agências de fomento pelo apoio financeiro, permitindo que o projeto fosse realizado.



## RESUMO

ISABELLA CAMPELO VILARDI ARGENTINO

### BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS TERMOFÍLICAS DA ANTÁRTICA PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTE

**Orientador: Alexandre Soares Rosado**

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

O continente antártico é conhecido por ser um ambiente extremo e por ser um dos ecossistemas mais severos da Terra. Este continente apresenta diferentes habitats, como a Ilha Deception, que é um vulcão polar ativo. O ambiente desta ilha é singular: apresenta atividade geotérmica, mesmo com 60% de seu território coberto por geleiras. As diferentes características ambientais apresentadas por esta ilha a tornam um habitat único para o estudo dos micro-organismos e seu potencial biotecnológico. O presente estudo teve como objetivo realizar a bioprospecção e identificação molecular de bactérias da Ilha Deception, capazes de produzir biossurfactantes sob condições termofílicas. Para realizar os procedimentos de *screening*, amostras de solo foram coletadas de diferentes pontos geotérmicos em Fumarole Bay e Whalers Bay, e analisadas no Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular (LEMM-UFRJ). Para o cultivo das bactérias termofílicas, foram utilizados seis meios de cultura diferentes: Lysogeny Broth, Marine Agar, Glucose Yeast Malt, Meio heterotrófico para *Bacillus* - DSMZ 260, Fitato de cálcio e National Botanical Research Institute's Phosphate, e as placas foram incubadas a 55 °C. Foram obtidos 245 isolados bacterianos termofílicos que foram depositados na Coleção de Bactérias Antárticas (LEMM-UFRJ). Após uma triagem para selecionar as amostras produtoras de biossurfactantes pelo teste da gota, vinte e cinco cepas foram selecionadas, incluindo 21 bacilos gram-positivos e quatro bacilos gram-negativos. Na análise molecular, foram encontradas seis cepas de *Geobacillus stearothermophilus*, quatro de *Geobacillus caldoxylosilyticus*, e seis de *Anoxybacillus flavithermus*. Dois isolados não puderam ser identificados, pois suas sequências foram relacionadas com bactérias não cultiváveis. O sobrenadante foi obtido por crescimento em caldo Bushnell-Haas, suplementado com 2% de extrato de levedura e incubado em um *shaker* a 55 °C, durante sete dias, a 165 rpm. Os testes realizados para estudar a produção de biossurfactante foram: teste de produção de espuma, teste de hemólise, teste do colapso da gota, teste de deslocamento de óleo e teste de emulsificação (E24) usando óleo cru e diesel, e teste da estabilidade do biossurfactante a alta temperatura, também usando óleo cru e diesel. Nos ensaios de *screening*, 22 isolados apresentaram boa produção de espuma, e 17 apresentaram resultados positivos no teste de deslocamento de óleo. No teste da hemólise, sete amostras apresentaram resultado positivo. Todos os resultados foram negativos para o teste de colapso da gota e oito isolados apresentaram os melhores resultados no teste de

emulsão (E24) usando petróleo bruto, e um com diesel. No teste da estabilidade do biossurfactante em alta temperatura, quatro isolados apresentaram bons resultados usando petróleo bruto, e um com diesel. Os outros isolados apresentaram características diferentes, como mudanças na água e na interface óleo/água. Os resultados mostram que a Ilha Deception apresenta bactérias termófilas com um alto potencial para a produção de biossurfactantes, uma informação inovadora para este ambiente. Através de novas análises, como teste de tensão superficial, poderemos entender melhor os recursos benéficos desses micro-organismos, bem como suas possíveis aplicações nos processos de biorremediação.

**Palavras-chave: Ilha Deception, vulcão polar, termofílicos, produção de biossurfactante, biorremediação.**

## ABSTRACT

ISABELLA CAMPELO VILARDI ARGENTINO

### BIOPROSPECTING OF BIOSURFACTANT PRODUCING THERMOPHILIC BACTERIA FROM ANTARCTICA

**Orientador: Alexandre Soares Rosado**

**Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

The Antarctica continent is known for its extreme environment and for being one of Earth's most harsh. This continent presents different habitats, such as Deception Island, an active polar volcano. The environment of this island is unique; it presents continuous geothermal activity, even with 60% of its territory covered by glaciers. The different environmental characteristics presented by this island make it a unique habitat for the study of microorganisms and their biotechnological potential. The present study aimed to realize the bioprospection and molecular identification of bacteria from Deception Island, capable of producing biosurfactants under thermophilic conditions. To perform the screening processes, soil samples were collected, from geothermal points on Fumarole Bay and Whalers Bay, and analyzed in the Laboratory of Molecular Microbial Ecology (LEMM-UFRJ). For the cultivation of thermophilic bacteria, six different culture media were used: Lysogeny Broth, Marine Agar, Glucose Yeast Malte, heterotrophic medium for *Bacillus* - DSMZ 260, Calcium Phytate and National Botanical Research Institute's phosphate, and the duplicate plates were incubated at 55 °C. Morphological and molecular analysis, and Gram staining were performed in order to characterize the isolates. By this isolation, 245 bacterial isolates that grew under thermophilic conditions were obtained, and they can be found at Antarctic Bacteria Collection (LEMM-UFRJ). After a screening to select as biosurfactant producing samples by the drop test, twenty five strains were selected, including 21 gram-positive bacilli and four gram-negative bacilli. In the molecular analysis, six strains of *Geobacillus stearothermophilus*, four of *Geobacillus caldoxylosilyticus*, six of *Anoxybacillus flavithermus*, and two of sequences that were related to non-cultivable bacteria were found. In each isolate, the supernatant was obtained by growing in Bushnell-Hass broth, supplemented with 2% Yeast extract and incubated in a shaker at 55 °C, for seven days, at 165 rpm. The tests carried out to study the production of biosurfactant were: foam production test, hemolysis test, drop collapse test, oil displacement test, emulsification test (E24) using crude oil and diesel, and test of the stability of the biosurfactant at high temperature, also using crude oil and diesel. In the screening assays, good foam 22 isolates presented production, and 17 presented positive results in the oil displacement test. In the hemolysis test, seven samples showed positive results. All results were negative for the drop collapse test, and eight isolates revealed the best results in the emulsification test (E24) using crude oil, and one using diesel. In the test of the stability of the

biosurfactant at high temperature, four isolates presented good results using crude oil, and one using diesel. The other isolates showed different characteristics such as changes in water and in oil/water interface. The results show that Deception Island presents thermophilic bacteria with a high potential for biosurfactant production, an innovative information for this environment. Through new analyzes, such as surface tension test, we will be able to better understand the beneficial resources of these microorganisms, as well as their possible applications in bioremediation processes.

**Key-words: Deception Island, Polar volcano, Thermophiles, Biosurfactant production, Bioremediation.**

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b>	Molécula anfipática (monômero). Região polar (hidrofílica) e região apolar (hidrofóbica).	4
<b>Figura 2</b>	Ilustração da formação das micelas (concentração micelar crítica).	4
<b>Figura 3</b>	Fluxograma experimental.	14
<b>Figura 4</b>	Imagem da Ilha Deception.	15
<b>Figura 5</b>	Imagens dos sítios geotérmicos de Whalers Bay e Fumarole Bay.	15
<b>Figura 6</b>	Isolamento e teste da gota das amostras termofílicas.	28
<b>Figura 7</b>	Árvore filogenética dos isolados bacterianos desse trabalho.	32
<b>Figura 8</b>	<i>Screening</i> da produção de biossurfactante pelos isolados termofílicos.	34
<b>Figura 9</b>	Teste de emulsificação diesel.	36
<b>Figura 10</b>	Teste de emulsificação óleo.	37
<b>Figura 11</b>	Teste de emulsificação óleo cru temperatura 97 °C.	39
<b>Figura 12</b>	Teste de emulsificação diesel temperatura 97 °C.	40

**LISTA DE TABELAS E QUADROS**

<b>Tabela 1</b>	Relação das amostras coletadas em diferentes locais da Ilha Deception, Península Antártica.	16
<b>Quadro 1</b>	Meios de cultura utilizados, descrição e a quantidade dos componentes.	17
<b>Tabela 2</b>	Composição do meio Bushnell-Haas.	19
<b>Tabela 3</b>	Reagentes utilizados na reação de PCR.	21
<b>Tabela 4</b>	Resumo dos resultados de isolamento, caracterização e seleção de bactérias termofílicas antárticas.	26
<b>Tabela 5</b>	Quantificação de DNA dos 25 isolados termofílicos.	29
<b>Tabela 6</b>	Identificação dos isolados bacterianos produtores de biossurfactantes.	31
<b>Tabela 7</b>	Resultado do <i>screening</i> das bactérias produtoras de biossurfactante.	33
<b>Tabela 8</b>	Resultado do teste de emulsificação (E24): óleo cru e diesel.	35

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE TABELAS E QUADROS</b> .....	xiv
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1 Antártica e seus ambientes termofílicos</b> .....	1
<b>1.2 Biotecnologia</b> .....	2
<b>1.3 Surfactantes</b> .....	3
<b>1.4 Biossurfactantes</b> .....	5
<b>1.5 Produção de biossurfactante</b> .....	6
<b>1.6 Aplicações do biossurfactante</b> .....	8
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	11
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	13
<b>3.1 Objetivos gerais</b> .....	13
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	13
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	14
<b>4.1 Área de estudo e amostragem</b> .....	15
<b>4.2 Cultura, isolamento e caracterização de bactérias termofílicas antárticas</b> .....	17
<b>4.3 Identificação molecular das bactérias termofílicas da Antártica</b> .....	20
<b>4.3.1 Extração do DNA genômico das amostras</b> .....	20
<b>4.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação parcial do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal (<i>rrs</i>)</b> .....	20
<b>4.3.3 Sequenciamento parcial do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal</b> .....	21
<b>4.3.4 Análise das sequências</b> .....	22
<b>4.4 <i>Screening</i> de bactérias produtoras de biossurfactante</b> .....	23
<b>4.4.1 Obtenção do sobrenadante</b> .....	23
<b>4.4.2 Teste da produção de espuma</b> .....	23
<b>4.4.3 Teste da hemólise</b> .....	24
<b>4.4.4 Teste do colapso da gota</b> .....	24
<b>4.4.5 Teste do deslocamento do óleo</b> .....	24
<b>4.4.6 Teste de emulsificação (E24)</b> .....	25

<b>4.4.7</b> Avaliação da estabilidade do biossurfactante quando submetido à alta temperatura (97 °C) .....	25
<b>5 RESULTADOS</b> .....	26
<b>5.1</b> Isolamento, caracterização e seleção de bactérias termofílicas antárticas.....	26
<b>5.2</b> Identificação molecular das bactérias termofílicas da Antártica.....	28
<b>5.3</b> <i>Screening</i> de bactérias produtoras de biossurfactante .....	32
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	48
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	49



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Antártica e seus ambientes termofílicos

Em consequência das suas condições climáticas, a Antártica é conhecida por ser um ambiente extremo e por ser um dos ecossistemas mais rigorosos da Terra (Cowan e Tow, 2004; Margesin e Miteva, 2011). Também é bastante conhecida por apresentar temperaturas negativas, alta salinidade, radiação intensa, baixa disponibilidade de água e nutrientes, períodos longos de ausência de luz e ciclos onde ocorrem congelamento e degelo (Dieser, Greenwood e Foreman, 2010; Cabrerizo *et al.*, 2012).

Esse continente apresenta diferentes habitats com características particulares, como vales secos, lagos subglaciais, geleiras, fumarolas marinhas e ambientes geotermiais polares (Christner *et al.*, 2014; Herbold *et al.*, 2014; Goordial *et al.*, 2016).

Essa atividade geotermal tem origem na transferência de calor do interior da Terra em direção à superfície e pode se manifestar de diversas formas. Uma forma importante é a atividade vulcânica (Boothroyd, 2009) e, na Antártica, a maior parte dos vulcões não apresenta sinais dessa atividade; somente quatro exibem habitats geotermiais ativos. Estes podem ser encontrados em Victoria Land – Montes Erebus, Melbourne e Rittmann, e um nas Ilhas Shetland do Sul – Ilha Deception (Herbold *et al.*, 2014), sendo os três primeiros vulcões continentais e o último, uma ilha vulcânica.

A Ilha Deception (62°58'S, 60°39'W) é um vulcão que tem forma de ferradura, e essa forma se dá pelo extravasamento do magma. É rodeada por morros e suas bordas são caldeiras inundadas pelo mar, formando uma bacia chamada de Port Foster (Barclay, Wilcock e Banez, 2009; Martí, Geyer e Aguirre-Diaz, 2013).

O ambiente dessa ilha é único, pois apresenta atividade geotermal contínua e a ilha tendo 60% de seu território coberto por geleiras, além da influência marítima. Essa atividade geotermal se torna visível por meio de emissão gasosa das fumarolas, que conseguem alcançar temperaturas acima de 100 °C (Llarch *et al.*, 1997; Amenábar *et al.*, 2013). As diferentes características ambientais apresentadas por essa ilha fazem com que seja um habitat único para estudo da microbiologia e de seu potencial biotecnológico (Bendia *et al.*, 2015).

Apesar de o ambiente único dessa ilha dificultar o acesso e a permanência nesse local, há a presença de estações de pesquisas operantes e ruínas de centros antigos, assim como ruínas de antigas estações baleeiras, e é cada vez mais frequente esses ambientes naturais

serem afetados por situações como derramamento de combustíveis derivados do petróleo decorrentes de atividades humanas (Aislabie e Foght, 2010).

Essas atividades constituem bases de pesquisa científica (Llarch *et al.*, 1997), onde um grande número de pesquisadores ocupa o local e esse combustível é amplamente utilizado para geração de energia e aquecimento nessas estações. Somado a isso, houve um crescente aumento de turistas visitando a ilha (Aislabie, Saul e Foght, 2006; Tin *et al.*, 2009), e ela se tornou, ao longo dos anos, uma atração turística devido às suas características vulcânicas, como as fumarolas e as águas geotermiais, e também pelas suas antigas bases baleeiras, onde apresentam tanques baleeiros, ruínas de instalações humanas, assim como uma das maiores colônias de pinguins Chinstrap do mundo (Bartolini *et al.*, 2014; Cabrerizo *et al.*, 2016).

Devido a esses fatores, o vulcão Deception apresenta ambientes contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, sendo os sítios Fumarole Bay e Whalers Bay os mais impactados com este contaminante (Cabrerizo *et al.*, 2016).

Em relação à microbiologia presente no vulcão ativo Deception, poucos são os estudos que descreveram a comunidade microbiana, e estes são ainda mais escassos quando envolvem microbiologia aplicada e utilização biotecnológica como, por exemplo, micro-organismos produtores de biossurfactante nesse ambiente de condições extremas para serem utilizados em processo de biorremediação.

Um dos poucos trabalhos encontrados na literatura sobre a produção de biossurfactantes na Ilha Deception é o de Coronel-León e colaboradores (2015), que detectou a produção de biossurfactante pelo *Bacillus licheniformis* AL 1.1. A equipe realizou a caracterização química e analisou as propriedades emulsificantes, porém visou a sua utilização apenas na indústria de cosméticos.

## 1.2 Biotecnologia

O termo “biotecnologia” foi utilizado pela primeira vez por um engenheiro húngaro chamado Karl Erkey, em 1919 (Verma *et al.*, 2011). O conceito de biotecnologia não é para ser entendido pelo o que é produzido, e sim, pelo tipo de tecnologia utilizada para que esses produtos possam ser feitos (Paugh, 1997). Nessa nova era da industrialização, muitas indústrias clássicas estão sendo redirecionadas para uso de tecnologias emergentes, como para a área da biotecnologia, abrindo várias oportunidades de pesquisa (Banat, Makkar e Cameotra, 2000).

De uma maneira geral, podemos definir biotecnologia como qualquer técnica que utilize micro-organismos, partes destes ou as substâncias produzidas por esses micro-organismos para gerar produtos que possam melhorar a vida humana e o meio ambiente (Albagli, 1998; Verma *et al.*, 2011). Essas técnicas consistem em juntar e aplicar os princípios tanto da Biologia quanto da Engenharia, para que produtos possam ser criados ou aperfeiçoados e serem utilizados, por exemplo, em vacinas, alimentos, no aperfeiçoamento de plantas ou animais e os próprios micro-organismos para usos específicos (Albagli, 1998; Verma *et al.*, 2011).

Entre as principais tecnologias que surgiram desde a década de 1970, a biotecnologia é a que mais tem chamado atenção. Esse tipo de tecnologia foi primeiramente utilizado na indústria farmacêutica e já afetou substancialmente a saúde e a produção de materiais químicos (Gavrilescu e Chisti, 2005).

A biotecnologia é bem versátil, amplamente empregada na ciência e no cotidiano, e seus avanços têm sido muito rápidos. Atrelado a isso, o aumento da consciência por parte dos consumidores tem tornado possível o aumento da utilização de ferramentas biológicas como uma tecnologia chave para as indústrias químicas. Essas tecnologias não agredem o meio ambiente, e podem ser utilizadas em diversos contextos, como por exemplo, em recuperação e melhoramento de ambientes contaminados com petróleo (Belyaev *et al.*, 2004).

Os hidrocarbonetos de petróleo são matérias-primas essenciais em nossa sociedade atual, porém também representam um poluente ambiental muito difícil de tratar (Aulwar e Awasthi, 2016). Devido à sua baixa solubilidade em água e alta tensão interfacial, esses compostos não podem ser facilmente removidos de águas ou solos contaminados. Um dos métodos utilizados na remediação desses ambientes contaminados é a biorremediação, que nada mais é do que processos em que micro-organismos utilizam suas capacidades naturais a fim de degradar esses resíduos tóxicos (Sáenz-Marta *et al.*, 2015; Jemil *et al.*, 2016). Para esses processos de biorremediação, os biossurfactantes são ferramentas importantes, pois auxiliam os micro-organismos nessas etapas (Dehghan-Noudeh, Housaindokht e Bazzaz, 2005).

### 1.3 Surfactantes

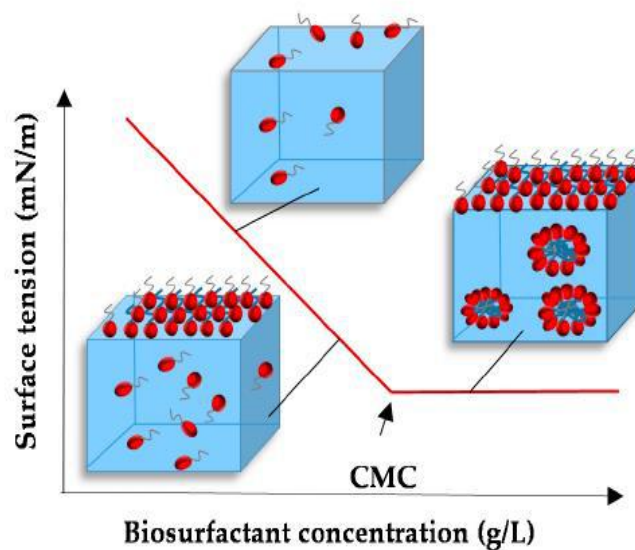
Surfactantes são moléculas orgânicas anfipáticas, possuindo porções hidrofílicas (polar) e hidrofóbicas (apolar) (Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2011) (**Figura 1**). Devido a essa estrutura, essas moléculas se acumulam em interfaces imiscíveis, ou seja, com diferentes

graus de polaridade e fluidez, como óleo/água ou ar/água. Dessa forma, ocorre a redução das tensões superficial (ar-líquido) e interfacial (líquido-líquido), permitindo que as duas fases distintas possam se misturar e interagir (Muthusamy *et al.*, 2008; Banat *et al.*, 2010).



**Figura 1** – Molécula anfipática (monômero). Região polar (hidrofílica) e região apolar (hidrofóbica). Fonte: Adaptado de Santos *et al.*, 2016.

Como resultado do acúmulo do surfactante e da interação entre as duas fases, há a formação de micelas, que são os monômeros aglomerados. Nesse contexto, a concentração micelar crítica (CMC) é definida como a concentração mínima do surfactante necessária para a formação das micelas (Menezes *et al.*, 2011) (**Figura 2**). A formação de micelas permite que o surfactante diminua a tensão interfacial e superficial e, com isso, aumenta a solubilidade e a biodisponibilidade de compostos orgânicos hidrofóbicos (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011; Rabiei *et al.*, 2013; Souza, Vessoni-Penna e Oliveira, 2014; Varjani e Upasani, 2017).



**Figura 2** – Ilustração da formação das micelas (concentração micelar crítica). Fonte: Santos *et al.*, 2016.

Por apresentarem essa característica, os surfactantes são uns dos mais versáteis compostos químicos existentes, muito utilizados para lavagem de solos contaminados (Mulligan, 2005), já que, além da sua capacidade de diminuir a tensão superficial, suas características conferem ótimas propriedades de emulsificação, detergência e dispersão (Desai e Banat, 1997).

Essas moléculas podem ser classificadas como surfactantes químicos, que possuem origem química, sendo a maioria sintetizada a partir do petróleo, como o SDS (sódio n-docenil sulfato), ou como surfactantes biológicos, chamados de biossurfactantes, advindos de micro-organismos (Jamil *et al.*, 2016).

#### **1.4 Biossurfactantes**

Os biossurfactantes são moléculas sintetizadas por uma grande variedade de micro-organismos, sendo estes produtos extracelulares ou partes da membrana celular, e possuem os mesmos mecanismos de ação dos surfactantes químicos (Desai e Banat, 1997; Mulligan, 2005).

Essas moléculas são caracterizadas por apresentarem estruturas variadas, como glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas a ácidos graxos, lipídios neutros, fosfolipídios, biossurfactantes poliméricos e particulados (Jemil *et al.*, 2016).

Os biossurfactantes, diferentemente dos surfactantes químicos que são classificados de acordo com a natureza do seu grupamento polar, são geralmente classificados pela origem microbiana e composição química (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011). Podem, também, receber uma classificação em função de seu peso molecular, estrutura molecular, propriedades físico-químicas e mecanismo de ação (Banat *et al.*, 2010; Inèse Dhouha, 2015).

Esses compostos podem ser divididos em duas classes principais (Neu, 1996): 1) moléculas que possuem baixo peso molecular, chamadas de biossurfactantes, como os lipopeptídeos, glicolipídios, proteínas; e 2) polímeros de polissacarídeos, e as moléculas de alto peso molecular, chamadas de bioemulsificantes, como lipopolissacarídeos ou lipoproteínas (Smyth *et al.*, 2010).

De acordo com o que foi proposto por Rosenberg e Ron (1999), pode-se obter um melhor desempenho desses compostos nas áreas em que são aplicados de acordo com a massa molecular. As moléculas com baixa massa molecular possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial de maneira mais eficiente, e os polímeros de alta massa molecular são considerados os mais eficazes como agentes estabilizadores de emulsão.

Comparados aos surfactantes quimicamente sintetizados, os biossurfactantes oferecem diversas vantagens, como baixa toxicidade, alta biodegradabilidade (Jemil *et al.*, 2016), aceitabilidade ecológica, por apresentar potencial de aplicação em proteção ambiental (Rahman *et al.*, 2002), e atividade quando condicionados a temperaturas extremas, pH e salinidade (Mulligan, 2005), capacidade de ser sintetizado a partir de matérias-primas renováveis (Nitschke e Pastore, 2006); esses compostos reduzem a tensão superficial com uma concentração micelar crítica muito baixa (Muthusamy *et al.*, 2008).

A principal vantagem do biossurfactante é pela sua baixa toxicidade e pelo pouco impacto ambiental que é causado. Os biossurfactantes têm recebido uma maior atenção uma vez que há a crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais. A baixa toxicidade dos biossurfactantes permite o seu uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (Nitschke, 2002). Por esse motivo, e também devido os surfactantes químicos serem derivados do petróleo, gerando grandes problemas para o meio ambiente, a procura pelos surfactantes naturais como uma alternativa aos surfactantes químicos, que são normalmente utilizados, tem aumentado cada vez mais (Nitschke e Pastore 2002).

no estudo realizado por Kanga e colaboradores (1997), foi observado uma vantagem oferecida pelos surfactantes naturais, onde os glicolípidos de espécies *Rhodococcus* 413A eram 50% menos tóxicos do que Tween 80 em testes de solubilização de naftaleno. Em outro estudo, os lipídeos de trealose, sintetizados por *Rhodococcus erythropolis*, apresentaram uma boa atividade de solubilização para compostos hidrofóbicos e grande potencial para serem aplicados na biorremediação de ambientes com contaminação de PHAs (Polihidroxicanoatos) (Reis *et al.*, 2013).

## **1.5 Produção de biossurfactante**

Os biossurfactantes são sintetizados principalmente, mas não exclusivamente, por micro-organismos, como bactérias e fungos. O tipo de biossurfactante, assim como a quantidade produzida, dependem, principalmente, do micro-organismo e da disposição de fontes de carbono e nitrogênio, de fatores ambientais, podendo essa produção ser espontânea ou induzida por variações no pH, temperatura, aeração e velocidade de agitação, pela presença de compostos lipofílicos ou quando o crescimento das células se dá em condições de estresse (Jara, Andrade e Campos-Takaki, 2013).

Para os processos de biorremediação em ambientes contaminados com petróleo, a fim de mimetizar o ambiente, os hidrocarbonetos são a fonte de carbono escolhida para o crescimento dos micro-organismos (Singer, 1985). Contudo, não são as únicas fontes de carbono que podem ser utilizadas. Estudos demonstraram a eficiência quando outros substratos foram utilizados, como melão e óleo de dendê, casca de batata, carboidratos e óleos vegetais (Gautam e Tyagi, 2006).

Os fatores que afetam o crescimento bacteriano, como a disposição de carbono e nitrogênio e fatores ambientais, acabam afetando diretamente a produção do biossurfactante (Desai e Banat, 1997; Mukherjee, Das e Sen, 2006), e a concentração da molécula vai aumentando de acordo com o crescimento das culturas (Bustamante, Durán e Diez, 2012). Muitos micro-organismos que possuem a capacidade de produzir biossurfactantes, e que são destinados para utilização industrial, foram isolados de efluentes, águas residuais e solos contaminados por diferentes poluentes, entre eles, o petróleo (Saharan, Sahu e Sharma, 2012).

Entre os biossurfactantes mais reconhecidos estão os ramnolipídeos, que são sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa*, a surfactina de *Bacillus subtilis*, o emulsan de *Acinetobacter calcoaceticus*, assim como os lipopeptídios que são sintetizados por muitos bacilos e outras espécies (Inès e Dhouha, 2015) e os soforolipídios de *Candida bombiloca* (primeiramente descrita como *Torulopsis bombicola*), um dos tipos de biossurfactantes produzidos por fungos (Cooper e Paddock, 1983). Esses micro-organismos são os mais conhecidos, porém não são os únicos capazes de produzir essas substâncias. Mais recentemente em um estudo realizado por Mani e colaboradores (2016), foi identificado um *Staphylococcus saprophyticus* SBPS 15, isolado do litoral da Índia, aparecendo como um promissor produtor de biossurfactante. Alguns metabólitos secundários produzidos por micro-organismos desse gênero vêm exibindo significância biomédica e biotecnológica (Eddouaouda *et al.*, 2012). Esse é um fato interessante uma vez que *Staphylococcus* é um gênero bem conhecido por suas infecções em humanos e animais e, no caso de algumas espécies, serem comensais (Popowicz *et al.*, 2006).

A razão da produção dessas moléculas por esses micro-organismos não é sempre tão óbvia. Por exemplo, algumas bactérias que estão presentes nos campos petrolíferos e que possuem a capacidade de degradar óleo, produzem biossurfactantes extracelulares (Bouchez *et al.*, 1999; Yakimov *et al.*, 1998). Nesse caso, esses compostos facilitam a absorção do óleo para que os micro-organismos possam degradar esses hidrocarbonetos (Koch *et al.*, 1991; Sekelsky e Shreve, 1999). Contudo, os micro-organismos que não possuem a capacidade de degradar óleo também são capazes de produzir biossurfactantes (Cooper e Zajic, 1980). Uma

explicação possível para esse fenômeno é que essas moléculas são produzidas como um sistema de defesa para o ataque de outros micro-organismos (Morikawa, Hirata e Imanaka, 2000).

Os biossurfactantes apresentam vantagens em relação aos surfactantes químicos. Contudo, poucos acabam sendo produzidos em larga escala devido ao alto custo de produção (Vaz *et al.*, 2012). Os altos custos provenientes da produção em larga escala podem ser reduzidos através da otimização dos processos (Cunha e Leite, 2000) e através de processos de engenharia econômica (Makkar e Cameotra, 1997).

Para que os biossurfactantes possam de fato serem utilizados, é necessária uma metodologia fácil, rápida e confiável para detectar essa produção com um número baixo de falsos positivos e/ou negativos (Youssef *et al.*, 2004). A produção dessas moléculas é, por vezes, detectada medindo o índice de emulsificação (Van Dyke *et al.*, 1993, Makkar e Cameotra, 1997), a atividade hemolítica (Carrillo *et al.*, 1996, Banat, 1993, Mulligan e Cooper, 1985), deslocamento do óleo (Morikawa, Hirata e Imanaka, 2000), colapso da gota (Jain *et al.*, 1991) e a tensão superficial (Bicca, Fleck e Ayub, 1999), por exemplo.

Ainda são poucos os estudos sobre biossurfactantes produzidos por bactérias termofílicas (Sharafi *et al.*, 2014). Alguns exemplos foram descritos por Banat (1993), onde foi relatada a produção de biossurfactante por uma cepa termofílica do gênero *Bacillus*, em que as moléculas eram estáveis até a temperatura de 50 °C. Esse mesmo gênero também já foi capaz de produzir biossurfactante estável em temperaturas até 80 °C (Joshi *et al.*, 2008).

Bharali e colaboradores (2011) conseguiram extrair da bactéria termofílica *Alcaligenes faecalis*, isolada do solo contaminado com petróleo bruto, um biossurfactante glicolípido. Nesse mesmo ano, três estirpes termofílicas que pertenciam aos gêneros *Geobacillus*, *Bacillus* e *Brevibacillus*, foram capazes de produzir esses surfactantes naturais que suportavam temperaturas na faixa de 37-55 °C (Mnif, Chaabouni-Ellouzee Ghribi, 2012).

## **1.6 Aplicações do biossurfactante**

Os biossurfactantes são moléculas que possuem diversas propriedades e, por esse motivo, podem ser utilizados em muitas áreas (Banat *et al.*, 2010; Maier e Soberon-Chavez, 2000). As propriedades superficiais mais importantes dessas moléculas que têm potencial para aplicação industrial são: redução da tensão superficial e capacidade de formação e estabilização da emulsão (Batista *et al.*, 2006).



Essas moléculas podem ser aplicadas em diferentes vertentes, como a na indústria farmacêutica, de alimentos, cosméticos, na limpeza de resíduos tóxicos de origem industrial e agrícola (Banat *et al.*, 2010; Sheet *et al.*, 2011; Saharan, Sahu e Sharma 2012), bem como na área da saúde como agentes antimicrobianos, imunorreguladores e imunomoduladores e possível papel na sinalização e atividade citotóxica (Muthusamy *et al.*, 2008).

Entretanto, a maioria dos trabalhos sobre biossurfactantes são sobre as aplicações na biorremediação de poluentes (Ron e Rosenberg, 2001; Araújo, 2014) e na recuperação de ambientes contaminados com óleo através da ação microbiana (Rosenberg e Ron, 1999). Esses compostos são ótimas ferramentas para auxiliar nesse processo de remediação, já que possuem a capacidade de alterar alguns componentes da superfície da célula bacteriana, resultando no aumento da acessibilidade dos hidrocarbonetos a essas células (Desai e Banat, 1997; Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011).

Entre as atividades realizadas pelas indústrias petrolíferas, com a utilização de biossurfactantes, estão a *Microbial Enhanced Oil Recovery* (MEOR), que é a recuperação melhorada do óleo em reservatórios através da manipulação de suas estruturas por micro-organismos (Shibulal *et al.*, 2017). Os mecanismos do MEOR incluem: formação de gás, produção de ácido, produção de polímeros, redução da viscosidade do óleo e das tensões superficial/interfacial. Algumas estratégias têm sido desenvolvidas para o uso de biossurfactantes nesse processo. O uso de injeção de micro-organismos produtores desses compostos, junto com nutrientes necessários para o suprimento dos mesmos, para que haja a multiplicação desses micro-organismos *in situ*, e a injeção de biossurfactantes produzidos *ex situ* diretamente no reservatório, são exemplos dessas estratégias (Pathak e Keharia, 2014).

Também é utilizado biossurfactantes na mobilização e redução de resíduos quando lodo e frações de óleo pesado ficam retidos no fundo de tanques de armazenamento de óleo (Nitschke e Pastore, 2002; Reis *et al.*, 2013), quando há obstrução do fluxo em tubulações que servem para passagem de óleo, onde resíduos muito viscosos, ou até mesmo na forma sólida, não conseguem ser retirados por bombas convencionais (Ghurye, Vipulanandan e Willson, 1994; Makkar e Cameotra, 1997; Bognolo, 1999), assim como na biorremediação de solos (Van Dyke *et al.*, 1993) e de águas subterrâneas que foram contaminadas com hidrocarbonetos e seus derivados (Ron e Rosenberg, 2001).

Uma vez que impactos ambientais relacionados à indústria petrolífera acontecem durante praticamente todas as etapas do processo (Wei, Mather e Fotheringham, 2005), ambientes em todo o mundo acabam sendo afetados por hidrocarbonetos de petróleo advindos dessas etapas (Atlas e Hazen, 2011). Portanto, é muito importante que processos de

recuperação desses ambientes contaminados sejam desenvolvidos para que esses problemas de poluição possam ser solucionados (Chaineau *et al.*, 2003). As propriedades dos biossurfactantes têm permitido o seu uso na remediação desses ambientes contaminados com compostos orgânicos e inorgânicos (Franzetti *et al.*, 2006). A biodegradação de hidrocarbonetos no solo é um processo complicado, porém esse processo pode ser auxiliado, e até intensificado, pela adição ou produção *in situ* de biossurfactantes pelos micro-organismos (Kosaric, 2001).

Nos processos de biorremediação *in situ*, dependendo das condições, é necessário que os micro-organismos sejam capazes de crescer e se adaptar em condições extremas de salinidade e temperatura (Nazina *et al.*, 2005). Um exemplo é o lipopeptídeo de *Bacillus licheniformis* JF-2 que é estável a temperaturas em torno de 75 °C por até 140 h (Nitschke, 2002). Em outro estudo realizado em 2014 por Sharafi e colaboradores, foi realizado o isolamento e identificação de uma estirpe de *Aneurinibacillus thermoaerophilus* que foi capaz de produzir biossurfactante em condições extremas de salinidade e temperatura. Essas bactérias foram isoladas de águas utilizadas em reservatórios de petróleo, e essas substâncias produzidas possuem várias aplicações industriais. Uma espécie termotolerante do gênero *Bacillus*, que conseguiu crescer em temperaturas de até 50 °C em um meio contendo hidrocarbonetos produziu biossurfactantes nessas condições, apresentando qualidades necessárias para ser utilizado em processos de MEOR (Banat, 1993). Assim sendo, esses micro-organismos produtores de biossurfactante, capazes de crescerem em condições extremas, apresentam potencial utilidade na indústria petrolífera (Couto, 2016).

Podem, ainda, ser utilizados em indústrias de cosméticos, na formulação de detergentes, em aditivos alimentares, como um uso combinado com enzimas para tratamento de efluentes (Reis *et al.*, 2013), e para o controle da formação de biofilmes bacterianos, uma vez que estudos comprovaram que biossurfactantes foram capazes de inibir a formação dessa estrutura em superfícies como poliestireno, plástico e vidro (Karimi *et al.*, 2012; Pradhan *et al.*, 2013).

## 2 JUSTIFICATIVA

O continente antártico é caracterizado por possuir condições abióticas extremas, influenciando diretamente todos os organismos que habitam esse local. Apesar de ser reconhecido pela paisagem predominantemente gelada, vulcões ativos também estão presentes no continente, como por exemplo, a Ilha Deception.

Devido ao mosaico de extremos ocasionados pelo próprio ambiente, a Ilha Deception apresenta diferentes nichos, onde micro-organismos psicofílicos, termofílicos e hipertermofílicos podem ser encontrados. De fato, os micro-organismos extremofílicos, principalmente os psicofílicos, são amplamente detectados e estudados na Antártica, entretanto, micro-organismos termofílicos e hipertermofílicos, associados principalmente a sítios geotermiais e fumarolas, respectivamente, ainda não são alvos de intensas pesquisas.

As temperaturas nos sítios geotermiais presentes na Ilha Deception atingem cerca de 50 a 65 °C na superfície, e nas fumarolas esses valores superam 100 °C. Os aspectos de temperaturas elevadas, com características vulcânicas e influência marítima, somado ao ambiente possuir geleiras e neve permanente, tornam a Ilha Deception um ambiente único na Antártica, porém dificultam o acesso e a permanência nesse local, tornando os estudos sobre os micro-organismos presentes nessa área ainda escassos.

Além do caráter taxonômico, os estudos realizados nessa área visam explorar o potencial biotecnológico dos micro-organismos presentes nesse ecossistema, como o presente estudo, que tem como objetivo o possível uso desses micro-organismos na produção de biossurfactantes e sua aplicação em processos de biorremediação, uma vez que auxiliam a ação de espécies degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo durante a remediação de ambientes contaminados.

Até a presente data, poucos são os estudos que relatam a microbiologia da ilha vulcânica Deception seja por métodos de cultivo ou independentes de cultivo, e ainda mais escassos trabalhos de microbiologia aplicada à indústria. Somado a isso, até o momento, trabalhos avaliando o potencial de estirpes isoladas de sedimentos da Ilha Deception em relação à produção de biossurfactantes também são bem restritos.

É importante que trabalhos com a finalidade de fornecer novas informações sobre os micro-organismos presentes nesse local e o seu potencial biotecnológico sejam realizados, uma vez que regiões polares são remotas, e a remediação de solos contaminados realizada no próprio local ou perto do local contaminado é bastante desejado. Por esse motivo, a

biorremediação acaba se tornando uma opção bastante atrativa, uma vez que é cada vez mais frequente a ocorrência de derramamento de combustíveis derivados de petróleo nessa ilha.

A proposta do presente trabalho está inserida em um projeto intitulado “Bioprospecção de bactérias termofílicas da ilha vulcânica Deception, Antártica”, realizado pela doutoranda Júnia Schultz (2015-2019) pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), também orientada pelo Prof. Dr. Alexandre Soares Rosado.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

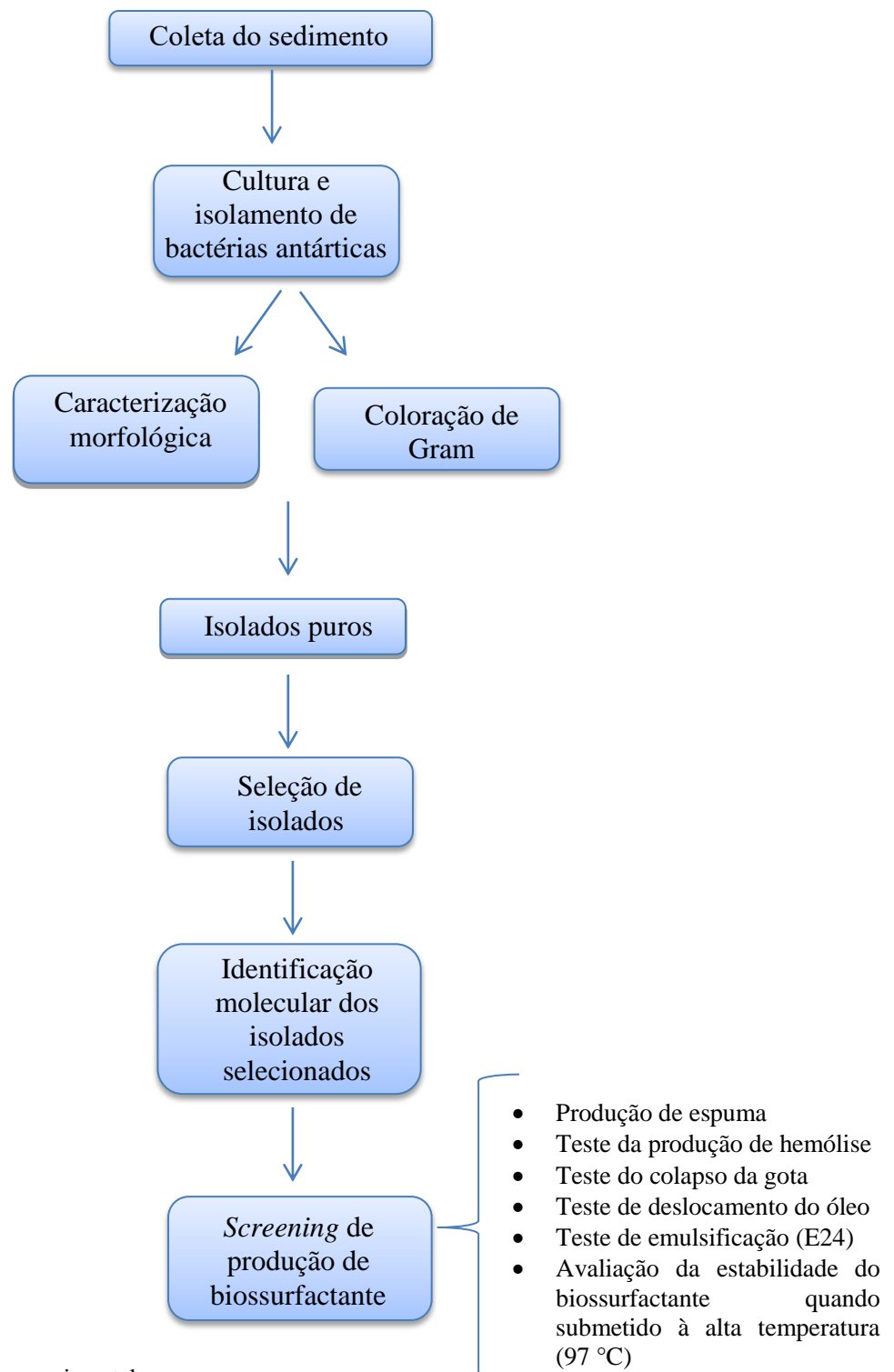
O presente estudo tem como objetivo verificar a produção de biossurfactantes a partir de bactérias termofílicas da Antártica, visando aplicação biotecnológica em processos de biorremediação de ambientes contaminados por petróleo.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Isolar bactérias termofílicas de amostras de sedimento vulcânico da Antártica e incluir os isolados na Coleção de Bactérias Antárticas do Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular (LEMM);
2. Caracterizar os isolados bacterianos termofílicos, através da morfologia e coloração de Gram;
3. Caracterizar molecularmente as amostras selecionadas para os testes de *screening*, através do sequenciamento do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal;
4. Verificar a produção de biossurfactantes dos isolados selecionados, através dos testes de *screening*: teste da produção de espuma, teste da hemólise, teste do colapso da gota, teste do deslocamento do óleo, teste de emulsificação (E24);
5. Avaliar a estabilidade do biossurfactante quando submetido à alta temperatura (97 °C);

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

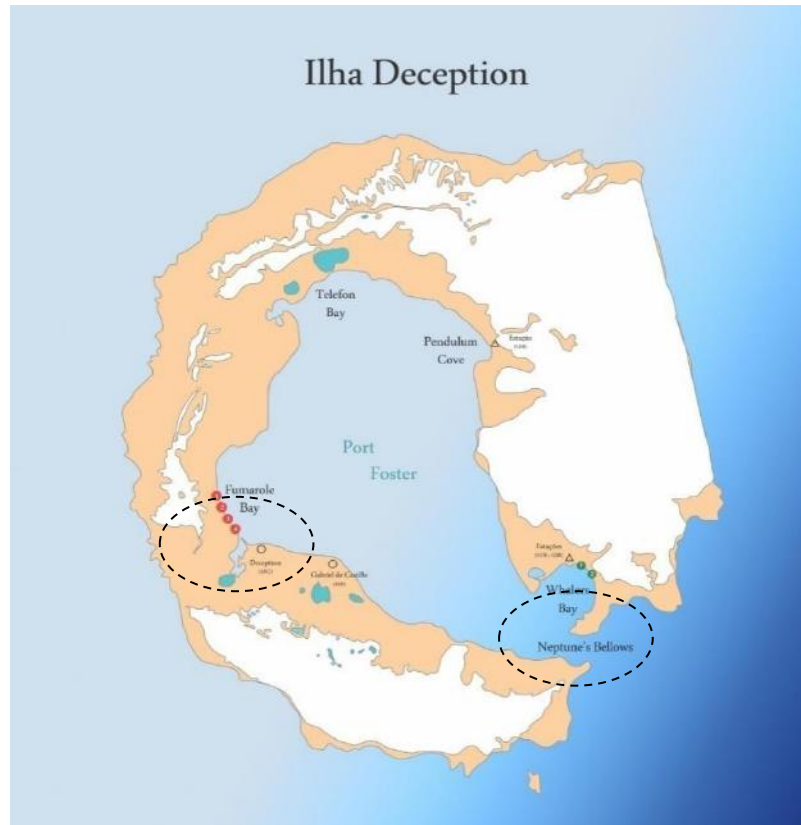
Todos os procedimentos que foram realizados nesse trabalho estão esquematizados, de maneira simplificada, nesse fluxograma experimental (Figura 3).



**Figura 3** – Fluxograma experimental.

#### 4.1 Área de estudo e amostragem

A busca por bactérias termofílicas que possuem a capacidade de produzir biossurfactantes se deu em diferentes ambientes geotérmicos da ilha vulcânica de Deception, pertencente ao arquipélago das Ilhas Shetland do Sul, noroeste da Península Antártica (Figura 4).



**Figura 4** – Imagem da Ilha Deception. Fonte: Schultz, 2016.

Os locais amostrados foram Whalers Bay e Fumarole Bay (Figura 5), sendo o primeiro uma pequena baía que se situa próximo à única entrada da Ilha Deception e à baía Port Foster, enquanto o segundo é onde estão localizadas as únicas bases de pesquisa científica operantes na Ilha – estações da Argentina e Espanha.



**Figura 5** – Imagens dos sítios geotérmicos de Whalers Bay (à esquerda) e Fumarole Bay (à direita). Fonte: imagens pessoais de Yuri Pinheiro (2016).

As coletas foram realizadas no verão austral de 2015/2016 na XXXIV OPERANTAR e, aproximadamente, 500 g de sedimento (0-5 cm de profundidade) foram coletados e transferidos para sacos plásticos estéreis (Whirl Pack®). Na **Tabela 1** é possível observar as características de cada sedimento coletado.

**Tabela 1** – Relação das amostras coletadas em diferentes locais da Ilha Deception, Península Antártica.

Local	Amostra	Coordenadas	Matriz	Temperatura (°C) do local na coleta
Whalers Bay	WB 1	62°58'47.5" S 60°33'20" W	Sedimento não coesivo e com pouca influência do mar	50
Whalers Bay	WB 2	62°58'45.7" S 60°33'20.8" W	Sedimento não coesivo e com pouca influência do mar	60
Fumarole Bay	FB 1	62°58'02.4" S 60°42'36.4" W	Sedimento não coesivo a 40 cm da fumarola	55
Fumarole Bay	FB 2	62°58'02.4" S 60°42'36.4" W	Sedimento não coesivo a 30 cm da fumarola	70
FumaroleBay	FB 3	62°58'02.4" S 60°42'36,4" W	Sedimento não coesivo a 20 cm da fumarola	80
FumaroleBay	FB 4	62°58'02.4" S 60°42'36.4 W	Sedimento não coesivo a 10 cm da fumarola	100

Fonte: Schultz (2016).



As amostras de sedimento coletadas foram estocadas levando em consideração sua finalidade de estudo, sendo que as amostras destinadas para cultivo foram acondicionadas em geladeira a 4 °C.

#### 4.2 Isolamento, caracterização e seleção de bactérias termofílicas antárticas

Para o cultivo das bactérias presentes no sedimento coletado da Antártica, as amostras foram armazenadas em geladeira a 4 °C no Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular (LEMM) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

As amostras de sedimento dos diferentes sítios geotérmicos foram homogeneizadas e 10 g foram transferidas para Erlenmeyers contendo 90 mL de solução salina (0,85%) e 3 g de pérolas de vidro, e esses Erlenmeyers foram agitados por 2 horas em um agitador orbital automático (*shaker*). Após, foram realizadas diluições seriadas, com 100 µL, de  $10^1$  a  $10^{-3}$  em microtubos de 1500 µL contendo 900 µL de solução salina estéril.

O plaqueamento desse material foi realizado pela técnica de *spread plate* (espalhamento em superfície), em duplicata, em placas de Petri. Cada placa continha um dos seis meios de cultura sólidos escolhidos para esse processo: Lysogeny broth, Marine Agar, Glicose Yeast Malte, meio heterotrófico para *Bacillus* – DSMZ 260, Fitato de cálcio, National Botanical Research Institute's phosphate (NBRIP). A composição dos meios serem utilizados está descrita no **Quadro 1**.

**Quadro 1** – Meios de cultura utilizados, descrição e a quantidade dos componentes.

Meio de cultura	Componentes do meio
Lysogeny Broth (LB) (Bertani, 1951)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Extrato de levedura – 5g</li> <li>• Peptona – 10g</li> <li>• NaCl – 10g</li> <li>• Agar bacteriológico – 20g</li> <li>• Para 1000mL de água destilada</li> </ul>
Marine Agar – DIFCO 2216 (MA) (Zobell, 1941)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptona – 5g</li> <li>• Extrato de levedura – 1g</li> <li>• Citrato férrico – 0,1g</li> <li>• Cloreto de magnésio – 8,8g</li> <li>• Sulfato de sódio – 3,24g</li> <li>• Cloreto de cálcio – 1,8g</li> <li>• Cloreto de potássio – 0,55g</li> <li>• Bicarbonato de sódio – 0,16g</li> <li>• Brometo de potássio – 0,08g</li> <li>• Cloreto de estrôncio – 34mg</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido bórico – 22mg</li> <li>• Silicato de sódio – 4mg</li> <li>• Fluoreto de sódio – 2,4mg</li> <li>• Nitrato de amônio – 1,6mg</li> <li>• Fosfato dissódico – 8 mg</li> <li>• Agar bacteriológico – 15g</li> <li>• Para 1000mL de água destilada</li> </ul>
Glucose Yeast Malt (GYM) (Méndez <i>et al.</i> , 1985)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glicose – 4g</li> <li>• Extrato de levedura – 4g</li> <li>• Extrato de malte – 10g</li> <li>• Carbonato de cálcio – 2g</li> <li>• Agar bacteriológico – 20g</li> <li>• Para 1000mL de água destilada</li> </ul>
Meio heterotrófico para <i>Bacillus</i> (HBA) (DSMZ* 260)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O – 4g</li> <li>• KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1,5g</li> <li>• NH<sub>4</sub>Cl – 1g</li> <li>• MnSO<sub>4</sub>x H<sub>2</sub>O – 0,01g</li> <li>• MgSO<sub>2</sub> x 7 H<sub>2</sub>O – 0,2g</li> <li>• CaCl<sub>2</sub>x 2 H<sub>2</sub>O – 0,01g</li> <li>• Citrato de amônia férrica – 5mg</li> <li>• Solução traço SL-6 – 3mL</li> <li>• Piruvato sódico – 1,5g</li> <li>• Para 1000mL de água destilada</li> </ul>
Fitato de cálcio (FCA) (Richardson e Simpson, 2011)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glicose – 10g</li> <li>• (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,5g</li> <li>• KCl – 0,2g</li> <li>• MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O – 0,1g</li> <li>• Fitato de cálcio – 2g</li> <li>• Extrato de levedura – 0,5g</li> <li>• MnSO<sub>4</sub> – 0,005g</li> <li>• FeSO<sub>4</sub> – 0,005g</li> <li>• Agar bacteriológico – 1,5g</li> <li>• Para 1000mL de água destilada</li> </ul>
National Botanical Research Institute's Phosphate (NBRIP) (Nautiyal, 1999)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glicose – 10g</li> <li>• Fosfato de cálcio – 5g</li> <li>• MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O – 5g</li> <li>• MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O – 0,25g</li> <li>• KCl – 0,2g</li> <li>• (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,1 g</li> <li>• Agar bacteriológico – 1,5g</li> <li>• Azul de bromofenol – 0,025g</li> <li>• Para 1000mL de água destilada</li> </ul>

Todos esses meios de cultura foram selecionados para conseguir isolar o maior número possível de bactérias, com os mais diversos metabolismos. Isso assim foi pensado levando em consideração o ambiente extremo em que essas amostras foram coletadas e todas

as diferentes estratégias que essas bactérias desenvolveram para conseguirem se nutrir e crescer.

As placas foram incubadas em estufa por 48 h a 55 °C, e após esse período foi realizada a contagem de colônias em cada placa. Somente as placas que apresentarem de 10 a 50 colônias foram utilizadas para a realização do isolamento em placas de Petri pela técnica de esgotamento. A partir desses isolados bacterianos, foi realizada a caracterização morfológica e coloração de Gram.

Com as colônias puras, para fins de estocagem, uma colônia de cada amostra foi transferida para um tubo (tipo Falcon) de 50 mL contendo 5 mL de meio LB em caldo para enriquecimento. Quando um crescimento significativo foi detectado, uma alíquota de 100 µL foi transferida para um criotubo contendo 20% vv<sup>-1</sup> de glicerol e meio LB em caldo, e este foi armazenado em geladeira a 4°C por 20 minutos, seguido de 30 minutos no freezer a -20 °C e, por fim, estocado no freezer a -80 °C. Essas amostras entraram na Coleção de Bactérias Antárticas presente no Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular – UFRJ.

Adicionalmente foram escolhidas, aleatoriamente, 100 amostras. Uma alíquota de 100 µL de cada amostra, enriquecidas em caldo, foi transferida para placas (duplicata) contendo meio Bushnell-Hass (BH) com adição de 2% de óleo cru, com o intuito de selecionar isolados bacterianos capazes de degradar petróleo (**Tabela 2**).

**Tabela 2** – Composição do meio Bushnell-Haas.

Componentes do meio	Concentração
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,02 g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g L <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 g L <sup>-1</sup>
FeCl <sub>3</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,05 g L <sup>-1</sup>

Fonte: Atlas (1995).

As bactérias que apresentaram crescimento em placa com meio BH e óleo foram enriquecidas em caldo do mesmo meio e submetidas ao teste da gota, descrito por Youssef e colaboradores (2004). Em uma placa de 24 poços, 2 mL do meio BH, uma gota de óleo cru (aproximadamente 20 µL) e 160 µL dos micro-organismos crescidos, foram adicionados, nessa ordem. O teste foi realizado em triplicata para cada amostra, e uma triplicata de controle

negativo por placa. As placas foram incubadas em estufa a 55 °C e foram monitoradas diariamente para observar se o meio estava evaporando muito rápido devido à alta temperatura da estufa. Os resultados foram anotados em sete, 14 e 21 dias.

Esse teste foi realizado para avaliar de forma qualitativa a degradação do óleo pelos isolados bacterianos e para selecionar os que seriam utilizados para o *screening* de bactérias produtoras de biossurfactante, com base nos resultados mais significativos quando comparados ao controle negativo.

### **4.3 Identificação molecular das bactérias termofílicas da Antártica**

Com a finalidade de identificar as cepas bacterianas isoladas nesse trabalho, foi realizada a amplificação e sequenciamento das regiões de DNA codificadoras do RNA ribossomal 16S (gene *rrs*). As etapas dessa metodologia estão descritas nos tópicos a seguir.

#### **4.3.1 Extração do DNA genômico das amostras**

Para a extração do DNA genômico, foi transferida uma colônia da placa para um tubo (tipo Falcon), de 15 mL, com 5 mL de caldo BH suplementado com extrato de levedura 2% e foi incubado em estufa a 55 °C por 48 h. Após esse período, 1 mL dessa cultura foi utilizada para a extração através do kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

Uma vez realizada a extração, o DNA foi quantificado usando o kit Qubit® 2.0 Fluorometer dsDNA (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do manual. A qualidade do DNA extraído foi avaliada em gel de agarose 1% contendo DNA SYBR® Safe DNA gel Stain da Life Technologies™, na proporção de 3 µL para 100 mL de agarose, aplicando-se 3 µL da amostra com 2 µL de corante Loading Dye para eletroforese de DNA. Os géis foram submetidos a uma tensão elétrica de 90V em tampão TBE 0.5X durante 1 h, e após a corrida foram visualizados por transluminação de luz ultravioleta.

#### **4.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação parcial do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal (*rrs*)**

As reações de PCR foram feitas utilizando um termociclador (Applied Biosystems). Foi realizada a reação de PCR com um volume final de 55 µL, utilizando os iniciadores

universais 27f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG - 3') (Lane, 1991) e 1492r (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Turner *et al.*, 1999). Os reagentes, suas respectivas quantidades e concentração final na solução estão descritos na tabela a seguir.

**Tabela 3** – Reagentes a serem utilizados na reação de PCR.

Reagentes	Quantidade (µL)	Concentração final
Tampão	10	5X
Primer Forward 27f	0,5	10 µM
Primer Reverse 1492r	0,5	10 µM
Desoxirribonucleotídeos (dNTP)	1	200 µM
Enzima Taq-polimerase (Phire Hot Start II®)	0,5	1U/µL
Amostra (DNA)	5	De acordo com a quantificação do DNA do isolado
Água milli-Q estéril	32,5	-
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>-</b>

A mistura foi submetida a uma etapa inicial de aquecimento a 94 °C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de 40 segundos a 94 °C para desnaturação da fita de DNA, 1 minuto a 56 °C para anelamento dos primers, 2 minutos a 72 °C para extensão e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Após a reação da PCR, as amostras foram estocadas em freezer a -20 °C e a análise da amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose.

Para verificar se houve a amplificação do gene e sua integridade, uma alíquota de 3 µL de cada amostra foi submetida a eletroforese em gel de agarose (1,2%), contendo o corante SYBR® Safe, com tampão TBE 1X, à 100V por 40 minutos. O gel foi observado após essa etapa em um transiluminador de luz ultravioleta.

#### 4.3.3 Sequenciamento parcial do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal

Após a PCR, 90 µL dos produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% em TBE a 80 V por 1 h com o marcador de SYBR® Safe, sendo exposto à luz UV, no sistema de captura de imagem (Fisher Science Thermo Life, modelo 88A). Os

fragmentos foram extraídos do gel e purificados com o auxílio do GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), de acordo com o protocolo. Para fazer a quantificação do produto da PCR purificado, foi utilizado o fluorímetro Qubit® (Invitrogen).

O método de Sanger foi utilizado para sequenciar parcialmente o gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal, sendo realizado em sequenciador automático modelo ABI 3730XL (AppliedBiosystems), utilizando os iniciadores universais PAF (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e PHr (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3'), desenhados por Edwards e colaboradores (1989), bem como o iniciador universal 341f (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') (Muyzer, De Waal e Uitterlinden, 1993).

O sequenciamento de Sanger das amostras foi realizado no Australian Genome Research Facility (AGRF), na Universidade de Queensland, Austrália, por meio da parceria bilateral entre o LEMM e o Laboratório de Ecologia Microbiana do Prof. Paul Dennis.

#### 4.3.4 Análises das sequências

A qualidade das sequências obtidas pelo sequenciamento foi verificada por meio do programa Phred (Ewing e Green, 1998) e as sequências de alta qualidade de cada isolado foram montadas usando o programa BioEdit (Hall, 1999). As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas em bancos de dados não redundantes. Para isso, as sequências nucleotídicas encontradas foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information website), utilizando o programa BLAST para pesquisa das espécies. A identificação das espécies foi determinada baseada no melhor valor de resultado obtido quanto à similaridade.

Com os isolados identificados, foi construída uma árvore filogenética com o objetivo de observar as relações evolutivas entre as bactérias deste trabalho. Para a montagem da árvore filogenética e determinação dos vizinhos mais próximos, as sequências dos organismos mais similares foram adquiridas a partir da ferramenta BLAST e os dados reunidos em um único arquivo fasta. O alinhamento de todas as sequências foi realizado através da ferramenta ClustalW e posterior construção dos filogramas, ambos realizados no programa MEGA 7.0 (Kumar, Stecher e Tamura, 2016). Para tal, foi adotado o algoritmo Neighbor-Joining (Gascuel e Steel, 2006), o valor de *bootstrap* de 1000 replicatas (Kumar, Stecher e Tamura, 2016) e a raiz da árvore filogenética foi formada pela arquea *Desulfurococcus fermentans* como grupo externo.

#### **4.4 Screening de bactérias produtoras de biossurfactante**

A partir das amostras bacterianas isoladas na etapa anterior e dos resultados mais significativos no teste da gota, 25 isolados foram selecionados e reativados do estoque. Para isso, as amostras foram retiradas do freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  e mantidas a temperatura ambiente para descongelamento. Em seguida, uma alíquota de  $3\ \mu\text{L}$  de cada amostra foi retirada do criotubo e transferida para um tubo (tipo Falcon), de 15 mL, contendo 5 mL de meio BH em caldo suplementado com 2% de extrato de levedura. Essas amostras foram incubadas em estufa a  $55\ ^{\circ}\text{C}$  por 48 h, e assim que foi observado um crescimento significativo das culturas, estas foram utilizadas para a obtenção do sobrenadante (vide subtópico 4.4.1).

Com estas 25 bactérias termofílicas foram realizados procedimentos de *screening* para verificar a capacidade das mesmas em produzir biossurfactantes, tais como: teste da espuma, teste da hemólise, teste do colapso da gota, teste de deslocamento do óleo, teste de emulsificação (E24) e a avaliação da estabilidade do biossurfactante quando submetido à alta temperatura ( $97\ ^{\circ}\text{C}$ ). Todas as metodologias empregadas estão descritas a seguir.

##### **4.4.1 Obtenção do sobrenadante**

Com a finalidade de realizar outras metodologias para o *screening* das amostras, foi necessária a obtenção do sobrenadante das mesmas. Para tanto, a suspensão microbiana foi obtida pelo cultivo de cada amostra, em triplicata, em Erlenmeyers com volume final de 150 mL de caldo Bushnell-Haas suplementado com 2% de extrato de levedura, e incubados em um agitador orbital automático (*shaker*) a  $55\ ^{\circ}\text{C}$ , por 7 dias a 165 rpm (Mani *et al.*, 2016). Após a obtenção do crescimento, 1 mL das amostras passou por centrifugação durante 15 minutos a  $13.000\ \times\ g$  e o sobrenadante foi utilizado na realização dos ensaios, descritos a seguir.

##### **4.4.2 Teste da produção de espuma**

A produção de espuma também é um indicativo da presença de biossurfactante. O teste é bem simples e ajuda na confirmação da presença de biossurfactante quando os outros testes também são realizados (Pathak e Keharia, 2014; Atuanya, Dunkwu-Okafor e Udochukwu, 2016).

Esse fator pode ser observado, após o preparo do inóculo, por meio da agitação dos Erlenmeyers, durante 30 segundos. Se, após a agitação ocorrer a formação de espuma, será um resultado positivo, enquanto que o resultado será interpretado como negativo quando houver ausência de produção.

#### **4.4.3 Teste da hemólise**

Para verificar a produção de hemólise, foi utilizada a metodologia descrita em 1984 por Mulligan, Cooper e Neufeld. Após a obtenção do sobrenadante (vide tópico 4.4.1), 10 µL foram inoculados em placas contendo o meio sólido Agar Sangue (sangue desfibrinado de carneiro a 5% - LABORCLIN), assim como os controles positivo (SDS a 1%) e negativo (água destilada). Para a melhor visualização da produção de hemólise, os isolados foram inoculados em *spot*.

As placas foram incubadas em estufa por 48 h a 55 °C. Após esse período a presença de um halo transparente (zona de hemólise) ao redor das colônias foi verificada, e na presença do mesmo, sugere-se um resultado positivo.

#### **4.4.4 Teste do colapso da gota**

O sobrenadante obtido das amostras, como já descrito no item 4.4.1, foi submetido ao teste do colapso da gota (Jain *et al.*, 1991).

Em uma lâmina de vidro, uma gota de óleo cru foi espalhada, e 10 µL do sobrenadante centrifugado de cada amostra foram adicionados. Uma lâmina com os controles positivo (SDS a 1%) e negativo (água destilada) também foi preparada, seguindo o mesmo volume de 10 µL.

Na presença do biossurfactante, a gota do sobrenadante tenderá a se espalhar sobre a superfície oleosa devido à redução da tensão superficial do líquido. Para ser confirmada a ausência do biossurfactante, a gota terá que permanecer estável, sem apresentar nenhuma mudança em sua forma. O resultado foi observado em até um minuto após a realização do teste.

#### **4.4.5 Teste do deslocamento do óleo**

Como descrito por Morikawa, Hirata e Imanaka (2000), 10 µL de óleo foram adicionados em uma placa de Petri contendo 40 mL de água destilada. Posteriormente, 10 µL



do sobrenadante obtido das amostras, conforme indicado no item 4.4.1, foram adicionados no centro da camada de óleo. Placas com os controles positivo (SDS a 1%) e negativo (água destilada) também foram preparadas nas mesmas proporções. Na presença de biossurfactante, o óleo é deslocado e torna-se possível observar a formação de um círculo de cor mais clara. Na ausência do biossurfactante, essa zona circular mais clara não é formada.

#### **4.4.6 Teste da emulsificação (E24)**

O teste de emulsificação seguiu o protocolo proposto por Wei *et al.* (2005), utilizando óleo cru e diesel. Toda a vidraria teve que estar estéril e livre de qualquer resíduo para que não houvesse comprometimento dos resultados.

Após etapa descrita no item 4.4.1, 200 µL do sobrenadante foram transferidos para um tubo de vidro contendo 600 µL de água destilada e 1,2 mL de óleo cru/diesel. O mesmo procedimento foi realizado com os controles: SDS (1%) e água destilada, seguindo o volume equivalente do sobrenadante. Os tubos foram agitados por 1 minuto em vórtex, e os resultados foram analisados após 24 horas.

Para o cálculo do índice de emulsificação, a seguinte fórmula foi utilizada (1):

$$\% E = \frac{h(\text{emulsificação})}{h(\text{total})} \times 100 \quad (1)$$

Na qual **h** representa a altura da camada de emulsificação e a altura da coluna total, respectivamente (Cooper e Goldenberg, 1987).

#### **4.4.7 Avaliação da estabilidade do biossurfactante quando submetido à alta temperatura (97 °C)**

Este teste foi realizado com o intuito de averiguar a resistência e a estabilidade do biossurfactante quando submetido à alta temperatura. Para tanto, alguns dos isolados testados no teste de emulsificação (E24) foram utilizados, tanto com óleo cru quanto com diesel, e o mesmo procedimento do item 4.4.1 foi realizado para a obtenção do sobrenadante. Porém, antes de o adicionar aos tubos de ensaio, o mesmo foi aquecido a 97 °C por 15 minutos em banho-maria (Couto, 2016).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Isolamento, caracterização e seleção de bactérias termofílicas antárticas

Um total de 245 bactérias termofílicas foram isoladas de diferentes amostras provenientes da Ilha Deception, utilizando diferentes meios de cultura. Todos esses isolados foram caracterizados quanto a sua morfologia e coloração de Gram e, dessas, 100 foram escolhidas aleatoriamente para a seleção de espécies degradadoras de óleo cru. Destes, 81 isolados foram degradadores e posteriormente submetidos ao teste da gota para a seleção dos melhores degradadores.

A partir dos resultados observados no teste da gota e na caracterização morfológica, 25 isolados foram selecionados para a identificação molecular, bem como submetidos aos testes de *screening* para verificar a produção de biosurfactante.

Os resultados obtidos nessa parte do trabalho estão resumidos na **Tabela 4**.

**Tabela 4** – Resumo dos resultados de isolamento, caracterização e seleção de bactérias termofílicas antárticas.

Amostra	Caracterização morfológica macroscópica	Coloração de Gram	Teste da gota (resultados em triplicata)
76	Colônias com bordas bem irregulares, beges, brilhosa, pouco crescimento.	Bacilo gram +	- / - / +
77	Colônias pequeno-médias, borda irregular, beges claras, bastante crescimento.	Bacilo gram +	+++ / +++ / +++
79	Colônias bem pequenas, brilhosas, marrom-claro, bordas irregulares.	Bacilo gram +	- / + / +
82	Colônias marrons, pequenas, bordas irregulares, crescimento escureceu o meio.	Bacilo gram -	- / +++ / +++
87	Colônias pequeno-médias, bege claro, brilhantes, bordas regulares.	Bacilo gram +	++ / ++ / +++
94	Colônias beges, grandes, brilhosas, bordas regulares, crescimento escureceu o meio.	Bacilo gram +	+ / + / +
105	Colônias brilhosas e pequenas, bege amarronzado, bordas regulares.	Bacilo gram +	+ / + / +
118	Colônias médio-grandes, brilhosas, bordas regulares, cortou o ágar.	Bacilo gram +	- / - / -
126	Colônias bem pequenas, beges amarronzadas, brilhosas, borda regular.	Bacilo gram +	+ / - / +
133	Colônias pequeno-médias, beges, presença de cápsula, borda regular.	Bacilo gram +	- / - / -
148	Colônias médias, brilhosas, bordas	Bacilo gram +	- / - / -

	irregulares, de cor bege.		
150	Colônias pequenas, beges, bordas irregulares, brilhosas.	Bacilo gram -	- / - / -
157	Colônias pequenas, brilhosas (pouco), borda regular.	Bacilo gram +	+ / - / +
159	Colônias médio-grandes, cápsula, borda irregular, bege e brilhosa.	Bacilo gram +	+ / - / -
160	Colônias médio-grandes, borda irregular, bege e brilhosa.	Bacilo gram +	- / - / -
175	Colônias médias, brilhantes, mais escuro no centro, bordas regulares e transparentes.	Bacilo gram +	++ / ++ / +++
185	Colônias bem pequenas, brilhantes, borda regulares, quase transparentes.	Bacilo gram +	+ / + / +
202	Colônias com bordas irregulares, bege forte (mais forte no meio), elevação nas bordas.	Bacilo gram -	+ / + / ++
203	Colônias com bordas irregulares, bege forte (mais forte no meio), elevação nas bordas.	Bacilo gram +	+ / + / +
204	Colônias alaranjadas, brilhosas. Fez um corte no meio de cultura e houve crescimento nesse corte.	Bacilo gram +	+++ / ++ / ++
208	Colônias pequeno-médias, brilhosas, beges, bordas irregulares e mais claras, pouco crescimento.	Bacilo gram -	++ / + / ++
223	Colônias pequenas, pouco brilhosas, bordas irregulares.	Bacilo gram +	- / - / -
224	Colônias pequenas, pouco brilhosas, bordas irregulares, ótimo crescimento.	Bacilo gram +	- / - / -
225	Colônias pequeno-médias, beges, brilhosas, presença de cápsula, bordas irregulares e mais claras.	Bacilo gram +	+++ / - / +++
233	Colônias médio-grandes, beges, brilhosas, bordas irregulares, pouco crescimento.	Bacilo gram +	- / - / -

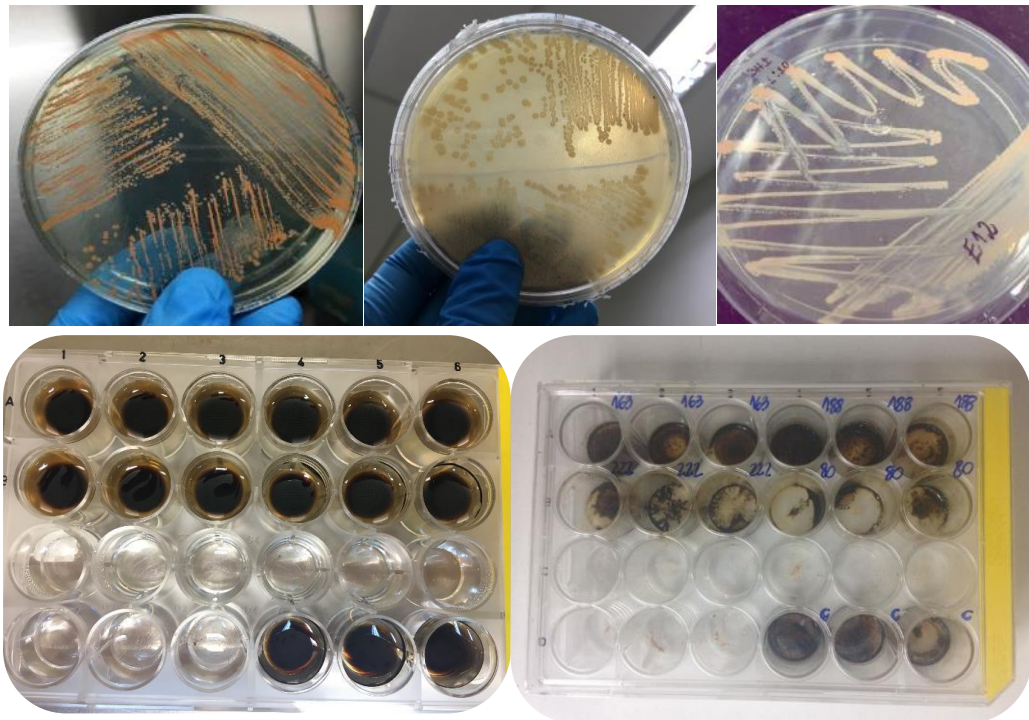
Não houve grande diferença entre as amostras em relação à caracterização morfológica. Apenas a amostra 204 apresentou uma característica interessante, que foi a capacidade de cortar o meio e conseguir crescer nesse corte. Esta mesma amostra apresentou também uma cor alaranjada, o que é bastante diferente das outras amostras que apresentavam cor bege e um tom mais amarronzado.

Quanto à caracterização em microscópio, todas as amostras foram identificadas como bacilos, sendo 21 dessas amostras classificadas como gram-positivas e quatro como gram-negativas.

No teste da gota, as amostras 77, 87, 175, 204 e 208 obtiveram os melhores resultados entre as 25 estirpes analisadas. Para ter um resultado mais confiável, seria necessário realizar

o teste novamente para as amostras 82, 126, 157 e 225, as quais obtiveram resultado negativo em uma das triplicatas.

A **Figura 6** é representativa de alguns resultados obtidos na etapa de isolamento (em cima) e no teste da gota para as amostras degradadoras (embaixo).



**Figura 6** – Isolamento das bactérias termofílicas (em cima) e teste da gota das amostras degradadoras (embaixo).

Fonte: imagens de Júnia Schultz (2017).

## 5.2 Identificação molecular dos isolados termofílicos da Antártica

Para a realização da PCR, e posterior sequenciamento, foi efetuada a extração do DNA genômico dos isolados selecionados. A quantificação do material obtido está representada na **Tabela 5**.

**Tabela 5** – Quantificação de DNA dos 25 isolados termofílicos.

Amostra	Quantificação
76	14,6 µg/mL
77	14,6 µg/mL
79	1,50 µg/mL
82	0,605 µg/mL
87	0,241 µg/mL
94	8,26 µg/mL
105	18,5 µg/mL
118	0,864 µg/mL
126	5,46 µg/mL
133	30 µg/mL
148	0,906 µg/mL
150	4,23 µg/mL
157	2,49 µg/mL
159	1,72 µg/mL
160	1,83 µg/mL
175	14,5 µg/mL
185	3,21 µg/mL
202	3,02 µg/mL
203	2,71 µg/mL
204	1,34 µg/mL
208	47,3 µg/mL
223	0,575 µg/mL
224	2,49 µg/mL
225	6,27 µg/mL
233	0,734 µg/mL

Através do sequenciamento parcial do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal, e da comparação com sequências homólogas depositadas no *GenBank*, os 25 isolados bacterianos foram identificados em gênero ou espécie. Os resultados de cada isolado estão listados na **Tabela 6**.

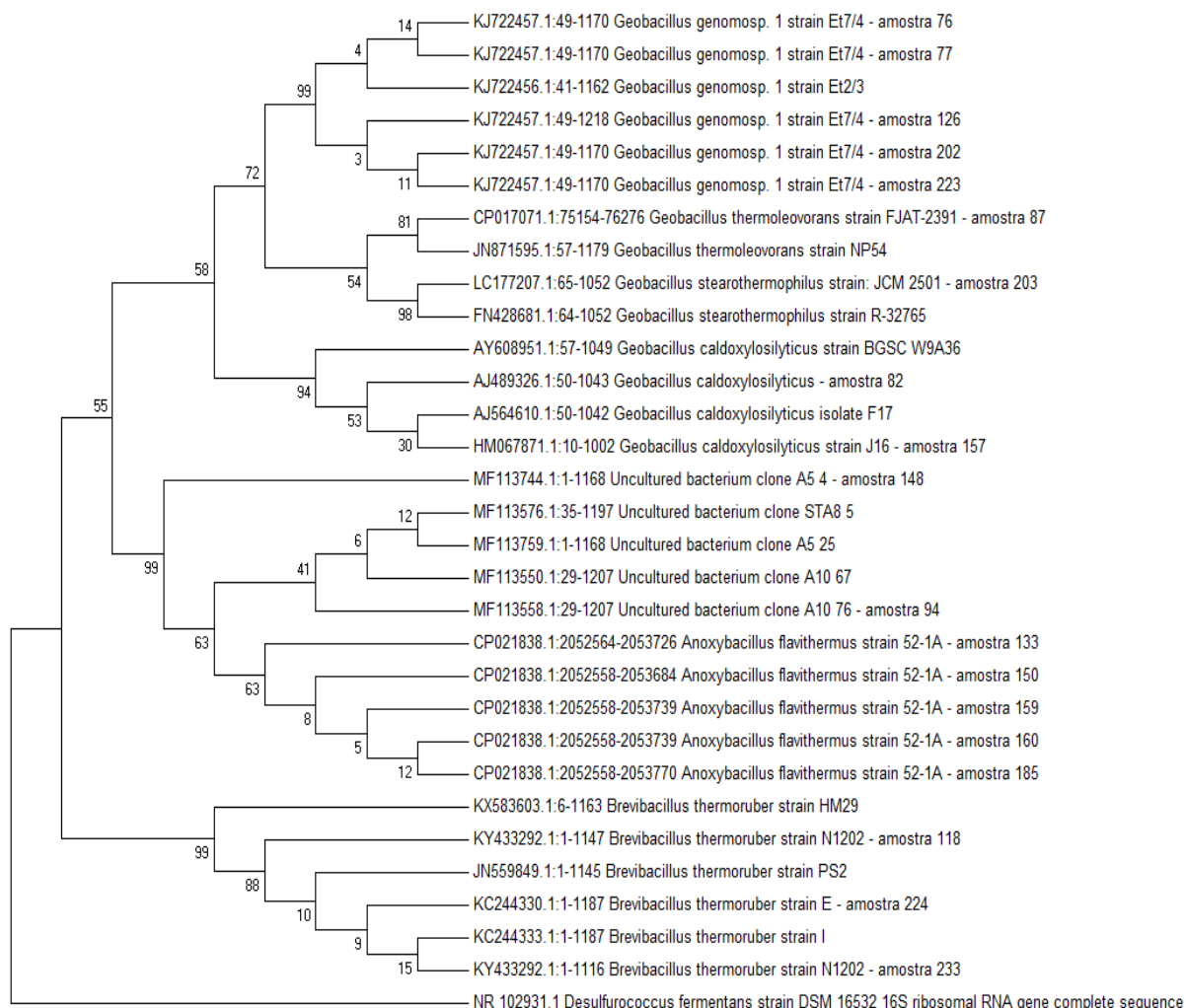
Dos 25 isolados identificados, 14 (56%) tiveram suas sequências alinhadas com sequências representativas do gênero *Geobacillus*, com identidade de 99% ou 100%. Dentre essas, predominaram os alinhamentos com as sequências das espécies *Geobacillus stearothermophilus* (43%) e *Geobacillus caldoxylosilyticus* (28%). A espécie *Anoxybacillus flavithermus* foi o segundo táxon com maior representatividade dentre os 25 isolados, com seis (24%) sequências alinhadas dentro dessa espécie.

Sequências homólogas as da espécie *Brevibacillus thermoruber* foram identificadas em três (12%) dos 25 isolados bacterianos. Por fim, duas (8%) sequências foram relacionadas com bactérias não cultiváveis.

**Tabela 6** – Identificação dos isolados bacterianos produtores de biossurfactantes.

Isolate number	Code	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
76	1	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> strain Et7/4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1583	1583	100%	0.0	99%	KJ722457.1
77	2	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> strain Et7/4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2054	2054	100%	0.0	99%	KJ722457.1
79	3	<i>Geobacillus</i> sp. ABR119 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1740	1740	100%	0.0	99%	JN315635.1
82	4	<i>Geobacillus caldxylosilyticus</i> 16S rRNA gene, isolate B70	1744	1744	100%	0.0	99%	AJ489326.1
87	5	<i>Geobacillus thermoleovorans</i> strain FJAT-2391, complete genome	2013	20062	100%	0.0	99%	CP017071.1
94	6	Uncultured bacterium clone A10_76 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1967	1967	100%	0.0	100%	MF113558.1
105	7	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> strain N1230 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1351	1351	100%	0.0	100%	KY433302.1
118	8	<i>Brevibacillus thermoruber</i> strain N1202 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1759	1759	100%	0.0	99%	KY433292.1
126	9	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> strain Et7/4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1417	1417	100%	0.0	100%	KJ722457.1
133	10	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> strain 52-1A, complete genome	1685	15087	100%	0.0	100%	CP021838.1
148	11	Uncultured bacterium clone A5_4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1522	1522	100%	0.0	100%	MF113744.1
150	12	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> strain 52-1A, complete genome	1644	14735	100%	0.0	100%	CP021838.1
157	13	<i>Geobacillus caldxylosilyticus</i> strain J16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1676	1676	100%	0.0	100%	HM067871.1
159	14	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> strain 52-1A, complete genome	1596	14303	100%	0.0	100%	CP021838.1
160	15	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> strain 52-1A, complete genome	1011	9051	100%	0.0	100%	CP021838.1
175	16	<i>Geobacillus caldxylosilyticus</i> strain T90 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1548	1548	100%	0.0	100%	KX113611.1
185	17	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> strain 52-1A, complete genome	1574	14074	100%	0.0	99%	CP021838.1
202	18	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> strain Et7/4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1347	1347	100%	0.0	100%	KJ722457.1
203	19	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: JCM 2501	1225	1225	100%	0.0	100%	LC177207.1
204	20	<i>Geobacillus thermantarcticus</i> strain DSM 9572 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	436	436	100%	1,00E-2,00E-	98%	NR_117157.1
208	21	<i>Geobacillus</i> sp. TFV-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	512	512	100%	141	100%	KX946196.1
223	22	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> strain Et7/4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	695	695	100%	0.0	100%	KJ722457.1
224	23	<i>Brevibacillus thermoruber</i> strain E 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	769	769	100%	0.0	100%	KC244330.1
225	24	<i>Geobacillus caldxylosilyticus</i> strain T90 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	612	612	100%	171	100%	KX113611.1
233	25	<i>Brevibacillus thermoruber</i> strain N1202 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	806	806	100%	0.0	100%	KY433292.1

Com o intuito de observar as relações evolutivas entre as bactérias presentes nesse trabalho, uma árvore filogenética foi construída com as amostras termofílicas identificadas (**Figura 7**).



**Figura 7** – Análise filogenética molecular dos isolados bacterianos deste trabalho pelo método *Maximum Likelihood*. A história evolutiva foi inferida usando o método de Neighbor-Joining. A análise envolveu 31 seqüências de nucleotídeos. A porcentagem de árvores replicadas, nas quais os taxons associados são agrupados pelo teste de bootstrap (1000 repetições), é mostrada ao lado dos ramos. Todas as posições que continham lacunas e dados em falta foram eliminadas. Houve um total de 861 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas em MEGA7.

### 5.3 Screening de bactérias produtoras de biossurfactante

As amostras utilizadas no *screening* de produção de biossurfactante foram selecionadas a partir do teste da gota, de acordo com uma classificação qualitativa da degradação do óleo pelos micro-organismos, e características morfológicas. A amostra 233

não cresceu na parte da obtenção do sobrenadante e, por esse motivo, não foi incluída nessa parte do trabalho.

**Tabela 7** – Resultados do *screening* das bactérias produtoras de biossurfactantes.

Amostra	Produção de espuma (resultados em triplicata)	Hemólise (resultados em duplicata)	Colapso da gota (resultados em triplicata)	Deslocamento do óleo (resultados em triplicata)
74	+++ / +++ / +++	+ / +	- / - / -	+ / + / +
77	+ / + / +	+ / +	- / - / -	+ / + / +
79	++ / ++ / ++	- / -	- / - / -	+ / + / +
82	++ / ++ / ++	- / -	- / - / -	- / - / -
87	+ / ++ / +	- / -	- / - / -	+ / + / +
94*	++ / ++	- / -	- / -	+ / +
105*	++ / ++	- / -	- / -	+ / +
118	+++ / +++ / +++	- / -	- / - / -	+ / + / +
126	+ / + / +	- / -	- / - / -	- / - / -
133	+ / + / +	- / -	- / - / -	+ / + / +
141	++ / ++ / ++	- / -	- / - / -	- / - / -
148*	++ / ++	- / -	- / -	+ / +
152	++ / ++ / ++	+ / +	- / - / -	- / - / -
157	+ / + / +	+ / +	- / - / -	- / - / -
159	++ / ++ / +	- / -	- / - / -	- / - / -
175	+ / + / 3 <sup>a</sup> triplicata não cresceu	- / -	- / - / 3 <sup>a</sup> triplicata não cresceu	+ / + / 3 <sup>a</sup> triplicata não cresceu
185	++ / ++ / +	- / -	- / - / -	+ / + / +
203*	+ / +	- / -	- / -	+ / +
204	++ / ++ / ++	+ / +	- / - / -	+ / + / +
208	+++ / +++ / +++	- / - / -	- / - / -	- / - / -
223	++ / ++ / ++	- / - / -	- / - / -	+ / + / +
225	++ / ++ / ++	- / - / -	- / - / -	+ / + / +
SDS	Não testado	+	+	+
Água destilada	Não testado	-	-	-

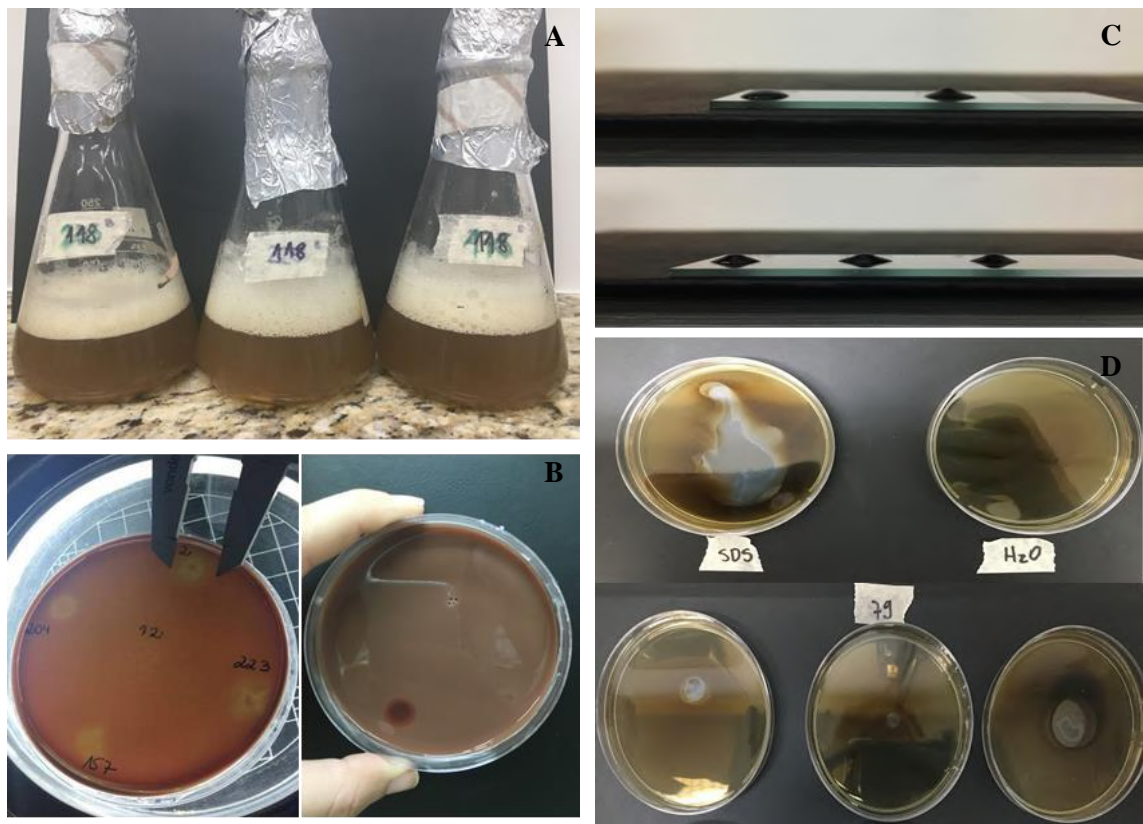
\* A triplicata foi realizada com o meio de cultura BH + L (2 deles) e BH + óleo cru (1 deles). Os resultados que foram levados em consideração foram os que foram realizados no BH+L, uma vez que não dava para ver com clareza os resultados obtidos nos Erlenmeyers contendo óleo cru.

No teste de produção de espuma (**Figura 8 - A**), todas as amostras tiveram resultado positivo, variando, apenas, na intensidade da formação da espuma e no tempo que essa camada demorava a desaparecer. Em duas amostras, 203 e 87, a espuma sumiu muito rapidamente, sendo que na de número 87 chegou a desaparecer. As amostras que obtiveram os melhores resultados (+++) em todas as triplicatas foram as de número 74, 118 e 208.

No teste da hemólise (**Figura 8 - B**), apenas sete amostras foram capazes de formar o halo que, nesse contexto, representa uma atividade hemolítica que pode ajudar a caracterizar uma amostra produtora de biossurfactante. Todas as amostras testadas no teste do colapso da gota obtiveram resultado negativo (**Figura 8 - C**).



No teste do deslocamento do óleo (**Figura 8 - D**), 17 das 22 amostras obtiveram resultado positivo.



**Figura 8** – *Screening* da produção de biosurfactante pelos isolados termofílicos. A – Teste da produção de espuma. B – Teste da hemólise. C – Teste do colapso da gota. D – Teste do deslocamento do óleo. SDS e água destilada utilizados como controles positivo e negativo para todos os testes, respectivamente.

O teste de emulsificação (E24), realizado com todas as 24 amostras, foi realizado em tubos de vidro contendo óleo cru, em temperatura ambiente. Dessas, 15 amostras também foram testadas em tubos contendo óleo diesel, também em temperatura ambiente. Os resultados obtidos a partir da média das triplicatas nessa parte do trabalho podem ser conferidos na **Tabela 8**.

**Tabela 8** – Resultados do teste de emulsificação (E24): óleo cru e diesel.

Amostra	Índice de emulsificação (%)	
	Óleo cru	Diesel
74	35	ND
77	50	ND
79	ND	56
82	50	ND
87	ND	8
94*	ND	10
105*	ND	4
118	ND	15
126	ND	6
133	ND	5
141	50	ND
148*	50	8
152	50	ND
157	50	ND
159	ND	11
175	100%/ND**	6
185	ND	8
203*	ND	4
204	45	ND
208	50	12
223	55	8
225	ND	4
SDS	60	60
Água destilada	-	-

\*A triplicata foi realizada com o meio de cultura BH + L (2 deles) e BH + óleo cru (1 deles). Os resultados que foram levados em consideração foram os que foram realizados no BH+L, uma vez que não dava para ver com clareza os resultados obtidos nos Erlenmeyers contendo óleo cru.

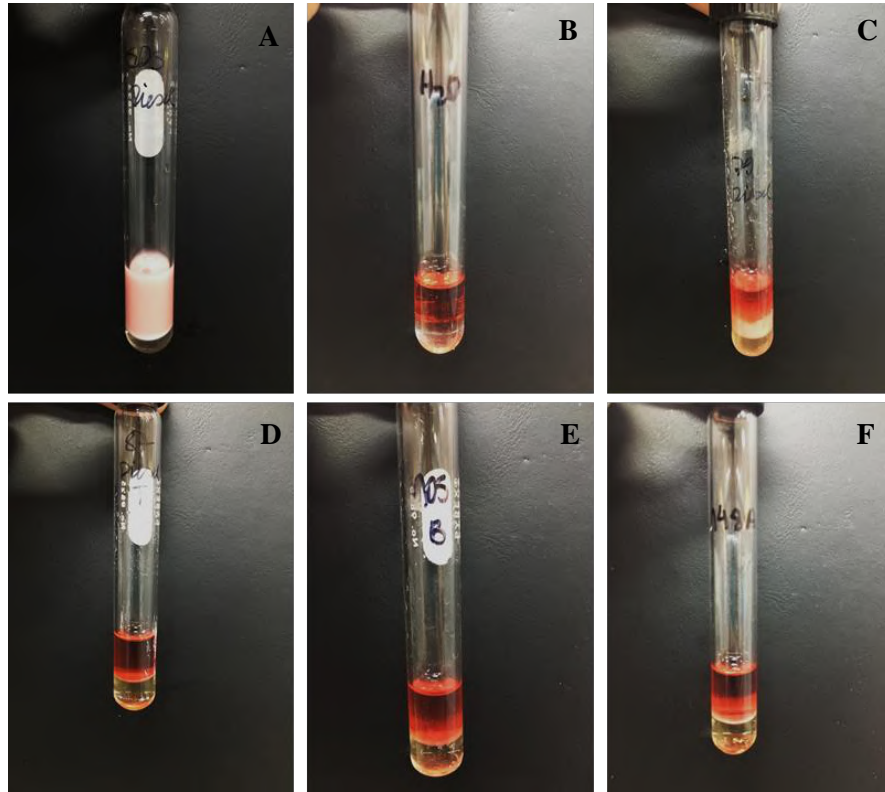
ND = Não determinado.

\*\* Não foi possível tirar a média.

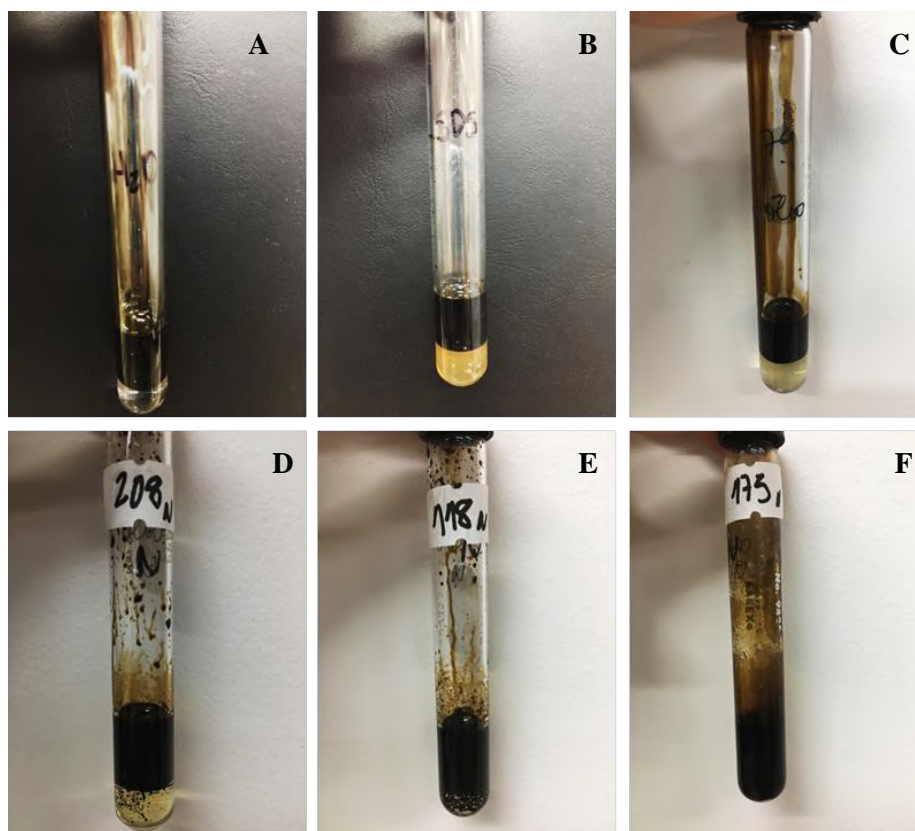
As amostras 74, 77, 82, 141, 152, 157 e 204 não foram testadas nos tubos contendo óleo diesel, e os resultados das amostras que foram testadas não foram muito significativos quando comparados ao controle. Apenas a amostra 79 se destacou apresentando um índice de emulsificação de 56% (**Figura 9**).

As amostras 79, 87, 94, 105, 118, 126, 133, 159, 185, 203 e 225 não apresentaram, de fato, uma camada emulsificada nos tubos contendo óleo cru. Porém, essas amostras apresentaram características significantes como algumas mudanças na coloração da água e/ou na interface óleo/água. Uma das triplicatas da amostra 175 não cresceu, e um dos dois tubos

apresentou as mesmas características mencionadas anteriormente. O outro tubo apresentou um índice de emulsificação de 100% (**Figura 10**).



**Figura 9** – Teste de emulsificação com diesel. A e B – controles positivo e negativo, respectivamente. C – melhor resultado positivo de uma amostra termofílica. D, E e F – amostras com resultado positivo.



**Figura 10** – Teste de emulsificação com óleo cru. A e B – controles negativo e positivo, respectivamente. C – resultado positivo de uma amostra termofílica. D e E – amostras com mudanças na coloração da água e na interface óleo/água. F – resultado com índice de 100% de emulsificação.

Essas amostras também foram testadas quanto à estabilidade do biossurfactante quando submetido a uma temperatura elevada. Nesse caso foram testadas 15 amostras em tubos contendo óleo cru e em tubos contendo óleo diesel, na temperatura de 97 °C. Os resultados obtidos a partir da média das triplicatas estão relacionados na **Tabela 9**.

**Tabela 9** – Resultados do teste de emulsificação (E24): óleo cru e diesel com o sobrenadante das amostras submetido a 97 °C.

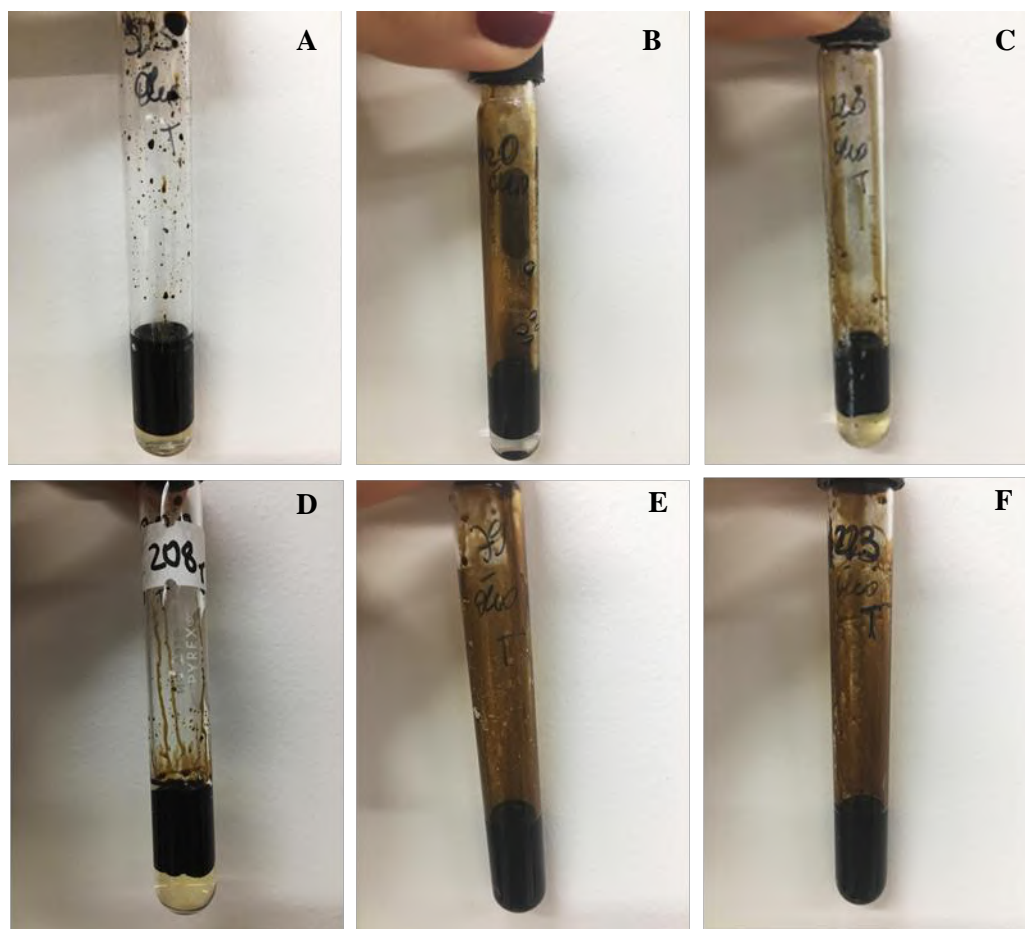
Amostra	Índice de emulsificação	Índice de emulsificação
	(%) Óleo cru	(%) Diesel
74	ND	ND
77	ND	ND
79	100	50
82	ND	ND
87	50	4
94*	ND	12
105*	ND	10
118	11	ND
126	ND	33
133	ND	15
141	ND	ND
148*	ND	10
152	ND	ND
157	ND	ND
159	ND	6
175	6	ND
185	ND	23
203*	ND	12
204	ND	ND
208	9	ND
223	100	4
225	50	6
SDS	60	60
Água destilada	-	-

\*A triplicata foi realizada com o meio de cultura BH + L (2 deles) e BH + óleo cru (1 deles). Os resultados que foram levados em consideração foram os que foram realizados no BH+L, uma vez que não dava para ver com clareza os resultados obtidos nos Erlenmeyers contendo óleo cru.

**ND** = não identificado.

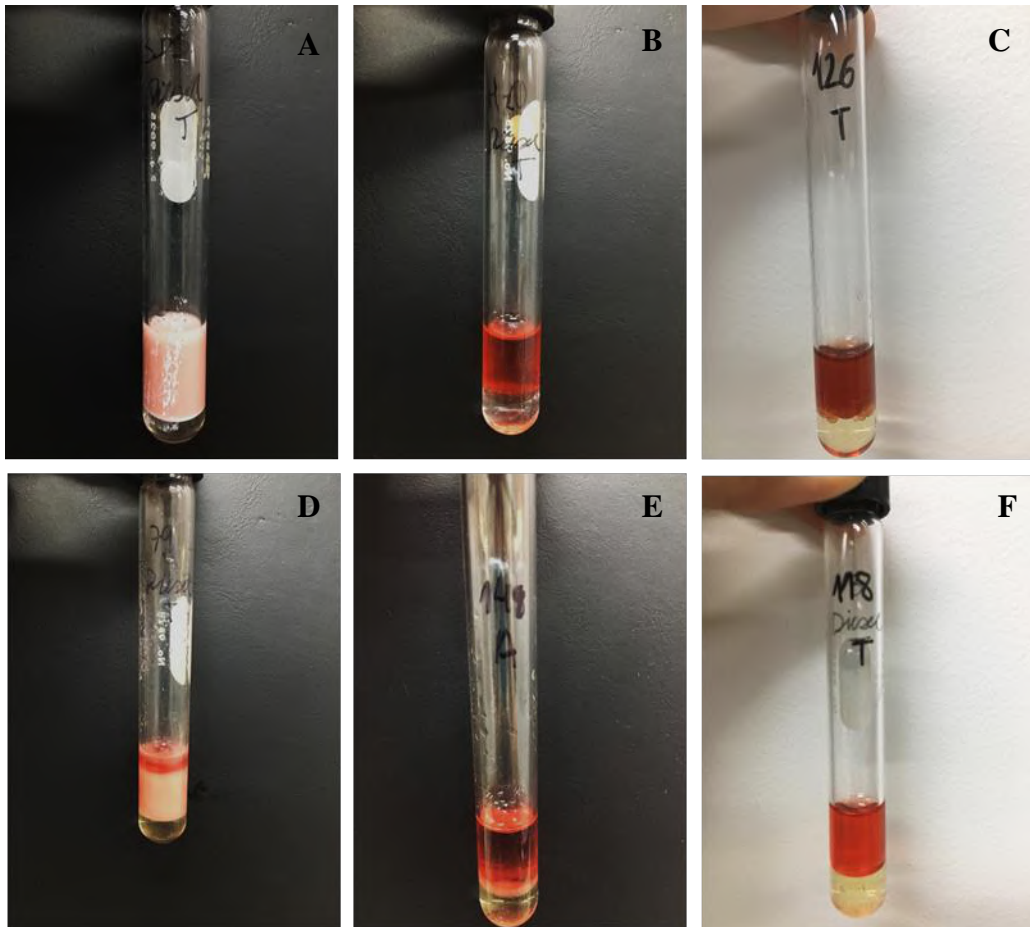
As amostras 74, 77, 82, 141, 152, 157 e 204 não foram testadas no teste de emulsificação com a temperatura de 97 °C, tanto nos tubos com óleo cru quanto nos tubos com diesel.

Nos tubos contendo óleo cru, as amostras 94, 105, 126, 133, 148, 159, 185 e 203 não apresentaram uma camada emulsificada, porém apresentaram algumas mudanças na coloração da água e/ou na interface óleo/água. As amostras 79, 87, 223 e 225 apresentaram os melhores índices de emulsificação entre as amostras testadas. Respectivamente os resultados foram: 100%, 50%, 100% e 50% (**Figura 11**).



**Figura 11** – Teste de emulsificação com óleo cru – sobrenadante à temperatura de 97 °C. A e B controles positivo e negativo, respectivamente. C e D – amostras com mudanças na coloração da água e na interface óleo/água. E e F – resultados com índice de emulsificação de 100%.

Nos tubos contendo diesel, não houve índice de emulsificação nas amostras 118, 175 e 208. A amostra 126, em uma das triplicatas, apresentou mudança significativa na cor do diesel, bolhas na interface diesel/água e apenas uma pequena parte com uma camada emulsificada. A amostra que apresentou o melhor índice de emulsificação quando comparada ao controle foi a amostra 79, que apresentou um índice de 50% (**Figura 12**).



**Figura 12** – Teste de emulsificação com diesel – sobrenadante submetido à temperatura de 97 °C. A e B – controles positivo e negativo, respectivamente. C – amostra com mudança na cor do diesel, bolhas na interface diesel/água e apenas uma pequena parte com uma camada emulsificada. D e E – amostras com resultado positivo. F – amostra com resultado negativo.

## 6 DISCUSSÃO

Os hidrocarbonetos de petróleo constituem uma importante matéria-prima para o desenvolvimento de nossa sociedade, porém possuem um papel importante na poluição ambiental. A biorremediação de ambientes contaminados com óleo é complexa, uma vez que o excesso desse poluente forma uma barreira contra a degradação microbiana. Nesse contexto, as moléculas de biossurfactante auxiliam esse processo, diminuindo a tensão superficial e interfacial óleo/água, aumentando, assim, sua mobilidade e biodisponibilidade e consequente biodegradação (Aulwar e Awasthi, 2016). Isso foi demonstrado em um trabalho recente de Patowary e colaboradores (2017), onde uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* PG1 foi capaz de produzir um composto de alta eficiência, uma vez que foi capaz de reduzir a tensão superficial, de 51,8 para 29,6 mN m<sup>-1</sup>, e teve concentração micelar crítica de 56 mg L<sup>-1</sup>.

Uma característica desejável para um biossurfactante é a capacidade de manter sua atividade em situações adversas. Dessa maneira, micro-organismos produtores de biossurfactantes capazes de suportar condições extremas facilitariam o processo de remediação *in situ* (Pathak e Keharia, 2014).

Diante disso, a Antártica é conhecida por ser um ambiente extremo devido, principalmente, às suas condições climáticas (Miteva, 2011). Essas condições podem permitir o desenvolvimento de bactérias com perfis metabólicos únicos. Apesar de ser predominantemente gelada e apresentar temperaturas negativas, um habitat particular presente nesse continente é a ilha vulcânica Deception (Boothroyd, 2009). As temperaturas extremas encontradas na ilha Deception dificultam o acesso e a permanência nesse local. Por esse motivo, os estudos sobre os micro-organismos presentes nessa área ainda são escassos.

Em uma pesquisa bibliográfica, realizada no dia 15 de novembro de 2017, na base dados *PubMed*, 15 artigos foram relacionados à busca “Deception Island Antarctica”, e apenas um relacionado a produção de biossurfactantes. Nesse trabalho, realizado por Coronel-León e colaboradores (2015), uma amostra termofílica, identificada como *Bacillus licheniformis* AL 1.1, isolada de solo não contaminado de Kroner lake (Whalers Bay), passou por testes para analisar a produção de biossurfactante. Além disso, foram verificadas as propriedades e a caracterização química do composto produzido. Por fim, através da otimização das condições de cultivo, os autores foram capazes de aumentar a produção do biossurfactante, obtendo também um composto estável em ampla gama de pH, altas temperaturas e concentrações variáveis de sal, podendo ser utilizado em processos industriais.



Visando o fornecimento de novas informações sobre os micro-organismos presentes na Ilha Deception e seu potencial biotecnológico, o objetivo desse trabalho foi analisar a produção de biossurfactantes por bactérias termofílicas isoladas de dois sítios geotermiais desse ambiente.

Com o intuito de atender as exigências metabólicas de diversos micro-organismos, os seis diferentes meios de cultura utilizados nesse estudo permitiram que 245 amostras bacterianas fossem isoladas. Essas amostras foram adicionadas a coleção do LEMM e, dentre essas, 25 foram selecionadas para os experimentos de bioprospecção.

A análise da coloração de Gram mostrou que, das 25 amostras, 21 foram classificadas como gram-positivas. Bicca, Fleck e Ayub (1999) relataram que a maioria das bactérias isoladas nesse trabalho, oriundas de locais com histórico de contaminação por óleo, ou subprodutos, foram classificadas como gram-negativas. Em outro estudo realizado em Victoria Land, Antártica, os isolados incluíram tanto bacilos quanto cocobacilos gram-positivos e gram-negativos, mostrando semelhança com os resultados obtidos nesse trabalho (Aislabie *et al.*, 2006). Com esses resultados, podemos chegar à conclusão de que as bactérias dos solos antárticos talvez sejam cosmopolitas, semelhantes às encontradas nos solos de todo o mundo. Essa característica facilitaria a utilização desses micro-organismos em diversos processos biotecnológicos e ambientes.

A identificação molecular dos isolados termofílicos mostrou a prevalência do gênero *Geobacillus* (56%), sendo identificado em 14 das 25 estirpes analisadas. A ocorrência de cepas de *Geobacillus*, *Brevibacillus* e *Bacillus* em ambientes contaminados com hidrocarbonetos não é incomum. Mnif e colaboradores (2011) isolaram, na temperatura de 55 °C três cepas pertencentes aos esses gêneros citados. No único estudo, mencionado anteriormente, sobre a Ilha Deception, Coronel-León e colaboradores (2015), relataram que a cepa isolada AL 1.1 possuía valor de similaridade de 100% com a cepa de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580.

Em outro estudo, realizado por Jara, Andrade e Campos-Takaki (2012), uma estirpe de *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986, isolada de solo contaminado com petróleo, foi capaz de produzir biossurfactante na temperatura de 45 °C. No trabalho realizado por AL-Jailawi, Nasir e Aziz (2015), 10 amostras bacterianas termofílicas foram testadas quanto à sua capacidade de produzir biossurfactante, e os resultados mostraram que uma cepa identificada como *Geobacillus thermoleovorans* (JQ 912239) foi a mais eficiente na produção dessas moléculas. Além da identificação de uma cepa de *G. thermoleovorans*, outras três, dentre as 10 amostras analisadas, tiveram suas sequências alinhadas com sequências representativas do

gênero *Anoxybacillus*. Além dos resultados positivos para a produção de biossurfactante, essas amostras mostraram boa capacidade de utilizar petróleo bruto e compostos aromáticos e, assim, puderam ser consideradas como um novo grupo de bactérias termofílicas degradadoras de hidrocarbonetos.

No trabalho de Mnif e colaboradores (2011), as bactérias isoladas de um campo de petróleo foram analisadas pelo potencial de degradação de hidrocarbonetos, e pela produção de biossurfactantes. A análise filogenética indicou que um dos isolados termofílicos pertencia à espécie de *Brevibacillus termoruber* (T1SS10), apresentando valores significativos tanto nos testes de degradação do óleo, quanto nos testes de produção de biossurfactantes.

Os testes de *screening* realizados nesse trabalho visaram explorar as propriedades dos biossurfactantes, como: diminuição da tensão superficial, emulsificação, detergência e dispersão. Essas características permitem a aplicação desses compostos na indústria (alimentos, couro, sabão, têxtil e farmácia), na mobilização de derrame de petróleo bruto, biorremediação de solo contaminado com óleo e MEOR, por exemplo. A realização dos testes de *screening* possui vantagens em exigir um pequeno volume das amostras, serem fáceis de realizar, e não precisarem de equipamentos altamente especializados (Plaza, Zjawiony e Banat, 2006).

Uma das propriedades importantes de um biossurfactante é a capacidade de formação de espuma. Isso já foi dito em inúmeros trabalhos como os de Pathak e Keharia (2014), Coronel-León e colaboradores (2015) e Sáenz-Marta e colaboradores (2015). No presente trabalho, a produção de espuma foi determinada por meio da agitação dos Erlenmeyers após o crescimento bacteriano durante sete dias e todas as amostras analisadas obtiveram resultado positivo, variando apenas na intensidade da formação da espuma. Outra maneira de analisar a formação de espuma foi descrita por Razafindralambo e colaboradores (1996) em um trabalho sobre as propriedades da surfactina, um biossurfactante lipopeptídico produzido por *Bacillus subtilis*. Nesse estudo, as propriedades de formação de espuma foram analisadas através de técnicas ópticas e condutimétricas, onde foi possível medir continuamente o volume e a fração líquida da espuma durante e após sua formação.

Em relação à produção de espuma, esta é decorrente da agitação imposta para a entrada de oxigênio e interação com os componentes presentes no meio de cultura para o crescimento celular e produção do biossurfactante (Wei *et al.*, 2005). Porém, esta característica nem sempre é benéfica para a eficiência da atividade do biossurfactante, como o encontrado por Bezerra (2012), que observou a diminuição da porcentagem de redução da tensão superficial em 5%.

Um estudo como o de Plaza, Zjawiony e Banat (2006), o teste da hemólise foi utilizado como um critério de seleção inicial para os testes de *screening* das amostras produtoras de biossurfactante. No presente estudo, o teste da hemólise fez parte dos testes de *screening* e, das 22 cepas testadas, sete apresentaram o halo de hemólise. Cabe ressaltar, como já foi relatado por Mulligan e colaboradores (1984) e Makkar e Cameotra (1997), que diferentes compostos produzidos pelos micro-organismos podem causar a hemólise no meio de cultura, não estando, necessariamente, a molécula de biossurfactante envolvida nesse processo. Assim, muitos autores recomendam que esse ensaio seja complementado com outros testes, principalmente baseados na tensão superficial.

Youssef e colaboradores (2004) realizaram o teste da hemólise concomitante com a análise da tensão superficial, e relataram que 13,5% das cepas analisadas foram capazes formar o halo. Além disso, foi observado que essas cepas reduziram a tensão superficial para valores abaixo de 40 mN/m. Na análise da produção de biossurfactante pelo *Geobacillus* sp. QT, uma bactéria termofílica e halofílica, feita por Xia e colaboradores (2016), oito das 26 cepas testadas obtiveram resultado positivo no teste da hemólise.

Outra técnica comumente utilizada no *screening* é o teste do colapso da gota; este é descrito como um método sensível e fácil de testar a produção de biossurfactantes por microrganismos (Jain *et al.*, 1991). Nessa técnica, se há o aumento da gota, é porque as moléculas adicionadas são polares e acabam sendo repelidas pela superfície hidrofóbica. Em contraste, se as moléculas adicionadas possuem surfactantes, a tensão superficial/interfacial é reduzida e há a propagação das moléculas adicionadas sobre a superfície hidrofóbica. No presente trabalho, foi utilizado óleo bruto. Todas as amostras bacterianas analisadas apresentaram resultado negativo nesse teste. Esse resultado relatado como negativo pode ser devido à quantidade de surfactante na amostra. Uma vez que a gota pode tanto aumentar, se espalhar um pouco ou colapsar, observar apenas a olho nu pode gerar dúvidas.

Para ter a certeza do resultado é aconselhado realizar um método quantitativo, onde um microscópio de dissecação e um micrômetro calibrado são utilizados para medir o diâmetro da gota após um minuto (Bodour e Miller-Maier, 1998). Diferente do presente trabalho, um estudo realizado por Nalini e Parthasarathi (2013), apresentou resultado positivo para 100% das amostras isoladas, também de solo contaminado com hidrocarbonetos. Em outro estudo, Elazzazy, Abdelmoneim e Almaghrabi (2014) também detectaram resultado positivo em 56% dos isolados analisados.

O teste do deslocamento do óleo é um bom indicador da produção de biossurfactantes, uma vez que depende somente da diminuição da tensão interfacial água/ óleo e não da

estrutura do biossurfactante produzido (Morikawa *et al.*, 2000). Além disso, essa técnica é mais sensível que o teste do colapso da gota para a detecção de baixos níveis de produção de biossurfactante (Youssef *et al.*, 2004).

No presente estudo, 14 das 22 amostras apresentaram resultado positivo para o deslocamento do óleo. Já Plaza, Zjawiony e Banat (2006) isolaram 16 cepas termofílicas de solos contaminados com hidrocarbonetos e de solos biorremediados, onde foi observado que 11 das 16 amostras obtiveram resultado positivo para o teste de colapso da gota e deslocamento do óleo. No entanto, cinco isolados foram positivos apenas no teste do deslocamento do óleo. Isso demonstra a importância de múltiplos ensaios de *screening* para a avaliação da produção do biossurfactante. Jemil e colaboradores (2016) observaram que o biossurfactante produzido a partir de um isolado de solo contaminado por hidrocarbonetos, apresentou melhores resultados no teste do deslocamento do óleo do que os controles utilizados (SDS e Tween 80), o que não foi observado no presente estudo, onde o SDS foi o que apresentou o melhor resultado.

A propriedade de emulsão é outra característica fundamental para que os biossurfactantes tenham bom desempenho em diferentes aplicações ambientais e industriais. Neste estudo, essa propriedade foi avaliada através do teste emulsificação utilizando o óleo cru e diesel, simulando ambientes contaminados com hidrocarbonetos. Em sua maioria, os resultados apresentados em diversos estudos mostram uma camada emulsificada e, com isso, é possível determinar o índice de emulsificação. Contudo, para algumas das amostras analisadas nesse trabalho, não foi possível determinar o índice, uma vez que não se conseguia diferenciar a camada emulsificada. Para essas amostras, as características apresentadas, como mudanças na coloração da água e na interface água/óleo, foram relatadas.

Para as amostras que apresentaram uma camada emulsificada, os índices foram calculados e os resultados variavam de 35 a 100%, sendo maior que o índice de emulsificação encontrado no controle SDS (60%). Em um trabalho realizado por AL-Jailawi, Nasir e Aziz (2015), 10 bactérias termofílicas foram isoladas de um solo contaminado com óleo. Os isolados foram submetidos ao teste da emulsificação, sendo o melhor resultado apresentado por uma cepa de *Geobacillus thermoleovorans* Ir1 (JQ912239), com um índice de emulsificação de 68%. Em outro estudo, uma cepa de *Bacillus subtilis* K1 também foi analisada no teste de emulsificação (Pathak e Keharia, 2014). Esse ensaio foi utilizado com hexano, heptano, octano e óleo de motor, representando hidrocarbonetos com diferentes tamanhos de cadeia. O índice de emulsificação foi menor no hexano (33,3%), e o maior no

óleo de motor (93,3%). Além desse resultado, pode ser observado que o índice aumentou de acordo com o aumento do comprimento da cadeia dos hidrocarbonetos.

Visando comparar os resultados obtidos com o óleo cru, foi analisada a camada de emulsificação foi também avaliada a partir do óleo diesel. Apenas uma amostra apresentou resultados significativos em relação controle, atingindo índice de emulsificação de 56%. Em um trabalho recente, A atividade de emulsão do sobrenadante da cultura de *Pseudomonas aeruginosa* PG1 foi testada (Patowary *et al.*, 2017). O teste foi realizado com n-hexadecano, querosene, óleo diesel, óleo de motor e petróleo bruto, obtendo índices de emulsificação de: 83, 88, 92, 86 e 100%, respectivamente. Apesar de não alcançar máxima atividade de emulsificação, o índice do óleo diesel (92%) foi maior do que o índice de 56% encontrado em nosso estudo.

Em outro trabalho, realizado por Ayed e colaboradores (2015), a solubilização e biodegradação de óleo diesel por moléculas de biossurfactantes, produzidas pela cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* An6, foi analisada. O índice de emulsificação foi de  $80 \pm 2\%$  para diesel bruto, enquanto que os dos surfactantes comerciais, Tween 80 e SDS, foram de  $75 \pm 2\%$  e  $67 \pm 1\%$ , respectivamente. Além disso, foi verificada que a camada emulsificada ficou estável durante uma semana, a temperatura ambiente, e sem qualquer alteração na atividade de emulsão. Por fim, o sobrenadante dessa cepa foi testado em temperaturas variando de 20 a 100 °C, obtendo índices de emulsificação de 80%, mostrando que o biossurfactante produzido poderia ser útil em ambientes extremos.

No presente trabalho, dentre as 22 amostras testadas com óleo, com o sobrenadante submetido à temperatura de 97 °C, duas obtiveram resultado positivo, com índices de emulsificação de 50 e 100%. Nos tubos contendo diesel, das 22 amostras testadas, uma apresentou resultado próximo ao do controle (60%), atingindo índice de 50%. Os resultados positivos obtidos sob alta temperatura (97 °C) sugerem que as substâncias produzidas por esses micro-organismos termofílicos não têm suas atividades alteradas, uma vez que seu metabolismo é adaptado para exercer suas funções da melhor maneira possível sob essas condições extremas.

Os ensaios de *screening* realizados em temperaturas extremas fornecem informações fundamentais para aplicações em processos de biorremediação *in situ*, onde a atividade do biossurfactante não pode ser reduzida quando sujeita as condições desses ambientes (Xia *et al.*, 2016).

Embora o crescente potencial dos biossurfactantes já venha sendo demonstrado, suas aplicações ainda são limitadas devido, principalmente, aos altos custos e a dificuldade de

otimização da produção. Assim, para o benefício deste campo, futuras pesquisas sobre a interação entre os hidrocarbonetos, surfactantes e componentes microbianos envolvidos nesse processo acabam tendo maior importância. Nesse estudo, foram identificadas amostras termofílicas isoladas da Ilha Deception, Antártica, e analisada a produção de biossurfactantes através de diferentes ensaios de *screening*. Futuramente, o teste da tensão da superficial fornecerá resultados mais conclusivos para a análise realizada. Por fim, após escolhido o melhor candidato, a otimização da produção do biossurfactante concluirá o objetivo do projeto, revelando o completo potencial biotecnológico da cepa selecionada.

## 7 CONCLUSÃO

- ✓ Foram incluídos 245 isolados na Coleção de Bactérias Antárticas do Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular (LEMM).
- ✓ Das 25 amostras selecionadas para os testes de *screening*, 21 foram classificadas como gram positivas e 4 como gram negativas. O gênero *Geobacillus* foi o gênero mais abundante, sendo identificado em 14 dessas amostras (56%).
- ✓ As amostras que obtiveram os melhores resultados nos testes de *screening* foram os isolados 74, 77, 79 e 204, sendo estes identificados como pertencentes ao gênero *Geobacillus*.
- ✓ A amostra que obteve o melhor resultado nos testes de estabilidade do biossurfactante sob altas temperaturas foi a amostra 79 (*Geobacillus* sp.).

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aislabie, J. M., Chhour, K. L., Saul, D. J., Miyauchi, S., Ayton, J., Paetzold, R. F., e Balks, M. R. (2006). Dominant bacteria in soils of Marble point and Wright valley, Victoria land, Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 3041-3056.
- Aislabie, J., e Foght, J. M. (2009). Response of polar soil bacterial communities to fuel spills. *Polar Microbiology: The Ecology, Biodiversity and Bioremediation Potential of Microorganisms in Extremely Cold Environments*, Ed. by AK Bej, J. Aislabie, and RM Atlas (CRC Press, Florida, 2009), 215-230.
- Aislabie, J., Saul, D. J., e Foght, J. M. (2006). Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles*, 10(3), 171-179.
- Albagli, S. (1998). Da biodiversidade à biotecnologia: a nova fronteira da informação. *Ciência da informação*, 27, 0-0.
- Amenabar, I., Poly, S., Nuansing, W., Hubrich, E. H., Govyadinov, A. A., Huth, F. e Bittner, A. M. (2013). Structural analysis and mapping of individual protein complexes by infrared nanospectroscopy. *Nature communications*, 4.
- Araújo, S. C. D. S. (2014). Expressão heteróloga de biosurfactantes identificados em bibliotecas metagenômicas (Master's thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Norte).
- Atlas, R. M., e Hazen, T. C. (2011). Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in US history.
- Atuanya, E. I., Dunkwu-Okafor, A., e Udochukwu, U. (2016). Production of Biosurfactants by Actinomycetes Isolated from Hydrocarbon Contaminated Soils and Ikpoba River Sediments in Benin-City, Nigeria. *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences*, 24, 45-52.
- Aulwar, U., Awasthi, RS. (2016) Production of Biosurfactant and their Role in Bioremediation. *J Ecosys Ecograph* 6:202.
- Ayed, H. B., Jemil, N., Maalej, H., Bayoudh, A., Hmidet, N., e Nasri, M. (2015). Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 99, 8-14.
- Banat, I. M. (1993). The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, 15, 591-594.
- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L. e Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 427-444.
- Banat, I. M., Makkar, R. S. e Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 495-508.
- Barclay, A. H., Wilcock, W. S. D. e Ibáñez, J. M. (2009). Bathymetric constraints on the tectonic and volcanic evolution of Deception Island Volcano, South Shetland Islands. *Antarctic Science*, 21, 153-167.
- Bartolini, S., Geyer, A., Martí, J., Pedrazzi, D., e Aguirre-Díaz, G. (2014). Volcanic hazard on Deception Island (South Shetland Islands, Antarctica). *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 285, 150-168.
- Batista, S. B., Mounteer, A. H., Amorim, F. R. e Totola, M. R. (2006). Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology*, 97, 868-875.
- Belyaev, S. S., Borzenkov, I. A., Nazina, T. N., Rozanova, E. P., Glumov, I. F., Ibatullin, R. R. e Ivanov, M. V. (2004). Use of microorganisms in the biotechnology for the enhancement of oil recovery. *Microbiology*, 73, 590-598.
- Bendia, A. G., Ballesteros, A. e Pellizari, V. H. (2015) Prokaryotic Communities Across a Geochemical and Temperature Gradient on an Antarctic Active Volcano (Deception Island). In *Anais do 6TH International Conference On Polar And Alpine Microbiology*.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis I.: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli* 1. *Journal of Bacteriology*, 62, 293.



- Bharali, P., Das, S., Konwar, B. K. e Thakur, A. J. (2011). Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: feasibility in petro-spill bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65, 682-690.
- Bicca, F. C., Fleck, L. C. e Ayub, M. A. Z. (1999). Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Revista de Microbiologia*, 30, 231-236.
- Bodour, A. A. e Miller-Maier, R. M. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 32, 273-280.
- Bognolo, G. (1999). Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152, 41-52.
- Boothroyd, I. K. (2009). Ecological characteristics and management of geothermal systems of the Taupo Volcanic Zone, New Zealand. *Geothermics*, 38, 200-209.
- Bouchez Naïtali, M., Rakatozafy, H., Marchal, R., Leveau, J. Y. e Vandecasteele, J. P. (1999). Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 421-428.
- Bustamante, M., Duran, N. e Diez, M. C. (2012). Biosurfactants are useful tools for the bioremediation of contaminated soil: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 12, 667-687.
- Cabrerizo, A., Dachs, J., Barceló, D. e Jones, K. C. (2012). Influence of organic matter content and human activities on the occurrence of organic pollutants in Antarctic soils, lichens, grass, and mosses. *Environmental Science & Technology*, 46, 1396-1405.
- Cabrerizo, A., Tejedo, P., Dachs, J., e Benayas, J. (2016). Anthropogenic and biogenic hydrocarbons in soils and vegetation from the South Shetland Islands (Antarctica). *Science of The Total Environment*, 569, 1500-1509.
- Carrillo, P. G., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S. I. e Giulietti, A. M. (1996). Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 82-84.
- Chaineau, C. H., Yepremian, C., Vidalie, J. F., Ducreux, J., e Ballerini, D. (2003). Bioremediation of a crude oil-polluted soil: biodegradation, leaching and toxicity assessments. *Water, Air, & Soil Pollution*, 144, 419-440.
- Christner, B. C., Priscu, J. C., Achberger, A. M., Barbante, C., Carter, S. P., Christianson, K., Michaud, A. B., Mikucki, A. J., Mitchell, C. A., Skidmore, L.M., Trista, J., Vick-Majors, J. e the WISSARD Science Team (2014). A microbial ecosystem beneath the West Antarctic ice sheet. *Nature*, 512, 310-313.
- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y. e Tiedje, J. M. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42, D633-D642.
- Cooper, D. G. e Goldenberg, B. G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 224-229.
- Cooper, D. G. e Paddock, D. A. (1983). *Torulopsis petrophilum* and surface activity. *Applied and environmental microbiology*, 46, 1426-1429.
- Cooper, D. G. e Zajic, J. E. (1980). Surface-active compounds from microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 26, 229-253.
- Coronel-León, J., de Grau, G., Grau-Campistany, A., Farfan, M., Rabanal, F., Manresa, A. e Marqués, A. M. (2015). Biosurfactant production by AL 1.1, a *Bacillus licheniformis* strain isolated from Antarctica: production, chemical characterization and properties. *Annals of Microbiology*, 65, 2065-2078.
- Couto, C. R. A. (2016). Produção de biossurfactantes por bactérias formadoras de endosporos e o impacto do uso de dispersantes em bacteriomas marinhos. Tese (doutorado em Ciências Biológicas – Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Cowan, D. A. e Tow, L. A. (2004). Endangered Antarctic Environments. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 649-690.
- Cunha, C. D. D. e Leite, S. G. F. (2000). Gasoline biodegradation in different soil microcosms. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 45-49.
- Dehghan-Noudeh, G., Housaindokht, M. e Bazzaz, B. S. F. (2005). Isolation, characterization, and investigation of surface and hemolytic activities of a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Journal of Microbiology-Seoul*, 43, 272.

- Desai, J. D. e Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 47-64.
- Dieser, M., Greenwood, M. e Foreman, C. M. (2010). Carotenoid pigmentation in Antarctic heterotrophic bacteria as a strategy to withstand environmental stresses. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 42, 396-405.
- Du Noüy, P. L. (1919). A new apparatus for measuring surface tension. *The Journal of General Physiology*, 1, 521.
- Eddouaouda, K., Mnif, S., Badis, A., Younes, S. B., Cherif, S., Ferhat, S. e Sayadi, S. (2012). Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation. *Journal of Basic Microbiology*, 52, 408-418.
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M. e Böttger, E.C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes: characterization of a gene coding 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17, 7843-7853.
- Ewing, B. e Green, P. (1998). Base-Calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8, 186-94.
- Franzetti, A., Di Gennaro, P., Bevilacqua, A., Papacchini, M., e Bestetti, G. (2006). Environmental features of two commercial surfactants widely used in soil remediation. *Chemosphere*, 62(9), 1474-1480.
- Gascuel, O. e Steel, M. (2006). Neighbor-joining revealed. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 1997-2000.
- Gautam, K. K. e Tyagi, V. K. (2006). Microbial surfactants: a review. *Journal of Oleo Science*, 55, 155-166.
- Gavrilescu, M., & Chisti, Y. (2005). Biotechnology – a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances*, 23, 471-499.
- Ghurye, G. L., Vipulanandan, C. e Willson, R. C. (1994). A practical approach to biosurfactant production using nonaseptic fermentation of mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 661-666.
- Goordial, J., Davila, A., Lacelle, D., Pollard, W., Marinova, M. M., Greer, C. W., DiRuggiero, J., McKay, C. P. e Whyte, L. G. (2016). Nearing the cold-arid limits of microbial life in permafrost of an upper dry valley, Antarctica. *The ISME Journal*, 10, 1613-1624.
- Gudiña, E. J., Rangarajan, V., Sen, R. e Rodrigues, L. R. (2013). Potential therapeutic applications of biosurfactants. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34, 667-675.
- Gudiña, E. J., Teixeira, J. A. e Rodrigues, L. R. (2016). Biosurfactants produced by marine microorganisms with therapeutic applications. *Marine Drugs*, 14, 38.
- Hall T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium* 41, 95-98.
- Herbold, C. W., Lee, C. K., McDonald, I. R. e Cary, S. C. (2014). Evidence of global-scale aeolian dispersal and endemism in isolated geothermal microbial communities of Antarctica. *Nature Communications*, 5.
- Inès, M. e Dhouha, G. (2015). Lipopeptides biosurfactants, main classes and new insights for industrial; biomedical and environmental applications. *American Peptide Society*.
- Jain, D. K., Collins-Thompson, D. L., Lee, H. e Trevors, J. T. (1991). A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 13, 271-279.
- Jara, A. M., Andrade, R. F. e Campos-Takaki, G. M. (2013). Physicochemical characterization of tensio-active produced by *Geobacillus stearothermophilus* isolated from petroleum-contaminated soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101, 315-318.
- Jemil, N., Ayed, H. B., Hmidet, N. e Nasri, M. (2016). Characterization and properties of biosurfactants produced by a newly isolated strain *Bacillus methylotrophicus* DCS1 and their applications in enhancing solubility of hydrocarbon. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 175.
- Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A. e Desai, A. J. (2008). Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, 99, 195-199.
- Kanga, S. A., Bonner, J. S., Page, C. A., Mills, M. A. e Autenrieth, R. L. (1997). Solubilization of naphthalene and methyl-substituted naphthalenes from crude oil using biosurfactants. *Environmental Science & Technology*, 31(2), 556-561.

- Karimi, M., Mahmoodi, M., Niazi, A., Al-Wahaibi, Y. e Ayatollahi, S. (2012). Investigating wettability alteration during MEOR process, a micro/macro scale analysis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95, 129-136.
- Karimi, M., Mahmoodi, M., Niazi, A., Al-Wahaibi, Y., e Ayatollahi, S. (2012). Investigating wettability alteration during MEOR process, a micro/macro scale analysis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95, 129-136.
- Koch, A. K., Käppeli, O., Fiechter, A. e Reiser, J. (1991). Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Journal of Bacteriology*, 173, 4212-4219.
- Kosaric, N. (2001). Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technology and Biotechnology*, 39(4), 295-304.
- Kumar, S., Stecher, G. e Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, msw054.
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, 125-175.
- Llarch, A., Logan, N. A., Castellví, J., Prieto, M. J. e Guinea, J. (1997). Isolation and characterization of thermophilic *Bacillus* spp. from geothermal environments on Deception Island, South Shetland Archipelago. *Microbial Ecology*, 34, 58-65.
- Llarch, A., Logan, N. A., Castellví, J., Prieto, M. J., e Guinea, J. (1997). Isolation and characterization of thermophilic *Bacillus* spp. from geothermal environments on Deception Island, South Shetland Archipelago. *Microbial ecology*, 34(1), 58-65.
- Maier, R. M. e Soberon-Chavez, G. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 625-633.
- Makkar, R. S. e Cameotra, S. S. (1997). Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 887-889.
- Mani, P., Dineshkumar, G., Jayaseelan, T., Deepalakshmi, K., Kumar, C. G. e Balan, S. S. (2016). Antimicrobial activities of a promising glycolipid biosurfactant from a novel marine *Staphylococcus saprophyticus* SBPS 15. 3 *Biotechnology*, 6, 163.
- Margesin, R. e Miteva, V. (2011). Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in Microbiology*, 162, 346-361.
- Martí, J., Geyer, A. e Aguirre-Diaz, G. (2013). Origin and evolution of the Deception island caldera (South Shetland Islands, Antarctica). *Bulletin of Volcanology*, 75, 732.
- Méndez, C., Brana, A. F., Manzanal, M. B. e Hardisson, C. (1985). Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Canadian Journal of Microbiology*, 31, 446-450.
- Menezes, C. T., Barros, E. C., Rufino, R. D., Luna, J. M. e Sarubbo, L. A. (2011). Replacing synthetic with microbial surfactants as collectors in the treatment of aqueous effluent produced by acid mine drainage, using the dissolved air flotation technique. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163, 540-546.
- Mnif, I., Chaabouni-Ellouze, S. e Ghribi, D. (2012). Optimization of the nutritional parameters for enhanced production of *B. subtilis* SPB1 biosurfactant in submerged culture using response surface methodology. *Biotechnology Research International*, 2012.
- Mnif, S., Chamkha, M., Labat, M., e Sayadi, S. (2011). Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. *Journal of applied microbiology*, 111(3), 525-536.
- Morikawa, M., Hirata, Y. e Imanaka, T. (2000). A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488, 211-218.
- Mukherjee, S., Das, P. e Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *TRENDS in Biotechnology*, 24, 509-515.
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133, 183-198.
- Mulligan, C. N. e Cooper, D. G. (1985). Pressate from peat dewatering as a substrate for bacterial growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 160-162.
- Mulligan, C. N., Cooper, D. G. e Neufeld, R. J. (1984). Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. *Journal of Fermentation Technology*, 62, 311-314.

- Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T. K. e Sivachidambaram, P. (2008). Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Current Science* (00113891), 94.
- Muyzer, G., De Waal, E.C. e Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695-700.
- Nalini, S., e Parthasarathi, R. (2013). Biosurfactant production by *Serratia rubidaea* SNAU02 isolated from hydrocarbon contaminated soil and its physico-chemical characterization. *Bioresource technology*, 147, 619-622.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170, 265-270.
- Nazina, T. N., Sokolova, D. S., Grigoryan, A. A., Shestakova, N. M., Mikhailova, E. M., Poltarau, A. B., Tourova, T. P., Lysenko, A. M., Osipov, G. A. e Belyaev, S. S. (2005). *Geobacillus jurassicus* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a high-temperature petroleum reservoir, and the validation of the *Geobacillus* species. *Systematic and applied microbiology*, 28, 43-53.
- Neu, T. R. (1996). Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological Reviews*, 60, 151.
- Nitschke, M. e Pastore, G. M. (2002). Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, 25, 772-776.
- Nitschke, M. e Pastore, G. M. (2006). Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology*, 97, 336-341.
- Pacwa-Płociniczak, M., Plaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z. e Cameotra, S. S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 633-654.
- Pathak, K. V., e Keharia, H. (2014). Application of extracellular lipopeptide biosurfactant produced by endophytic *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) in microbially enhanced oil recovery (MEOR). *3 Biotech*, 4, 41-48.
- Paugh, J. (1997). Meeting the challenge: US industry faces the 21st century: The US biotechnology industry. DIANE Publishing, pp 09-13.
- Plaza, G. A., Chojniak, J. e Banat, I. M. (2014). Biosurfactant mediated biosynthesis of selected metallic nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 13720-13737.
- Popowicz, G. M., Dubin, G., Stec-Niemczyk, J., Czarny, A., Dubin, A., Potempa, J. e Holak, T. A. (2006). Functional and structural characterization of Spl proteases from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Molecular Biology*, 358, 270-279.
- Pradhan, A. K., Pradhan, N., Mall, G., Panda, H. T., Sukla, L. B., Panda, P. K. e Mishra, B. K. (2013). Application of lipopeptide biosurfactant isolated from a halophile: *Bacillus tequilensis* CH for inhibition of biofilm. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171, 1362-1375.
- Priyadarshini, E., Pradhan, N., Pradhan, A. K. e Pradhan, P. (2016). Label free and high specific detection of mercury ions based on silver nano-liposome. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 163, 127-133.
- Rabiei, A., Sharifinik, M., Niazi, A., Hashemi, A. e Ayatollahi, S. (2013). Core flooding tests to investigate the effects of IFT reduction and wettability alteration on oil recovery during MEOR process in an Iranian oil reservoir. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 5979-5991.
- Rahman, K. S. M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P. e Banat, I. M. (2002). Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology*, 85, 257-261.
- Razafindralambo, H., Paquot, M., Baniel, A., Popineau, Y., Hbid, C., Jacques, P. e Thonart, P. (1996). Foaming properties of surfactin, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 149-151.
- Razafindralambo, H., Paquot, M., Baniel, A., Popineau, Y., Hbid, C., Jacques, P., e Thonart, P. (1996). Foaming properties of surfactin, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(1), 149-151.
- Reis, R. S., Pacheco, G. J., Pereira, A. G. e Freire, D. M. G. (2013). Biosurfactants: production and applications. *Biodegradation – Life of Science*. InTech.

- Richardson, A. E. e Simpson, R. J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant Physiology*, 156, 989-996.
- Ron, E. Z. e Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, 3, 229-236.
- Rosenberg, E. e Ron, E. Z. (1999). High-and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 154-162.
- Saharan, B. S., Sahu, R. K. e Sharma, D. (2012). A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, 2011, 1-14.
- Saimmai, A., Sobhon, V. e Maneerat, S. (2011). Molasses as a whole medium for biosurfactants production by *Bacillus* strains and their application. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165, 315-335.
- Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A. e Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 401.
- Sekelsky, A. M. e Shreve, G. S. (1999). Kinetic model of biosurfactant-enhanced hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnology and Bioengineering*, 63, 401-409.
- Sharafi, H., Abdoli, M., Hajfarajollah, H., Samie, N., Alidoust, L., Abbasi, H. e Noghabi, K. A. (2014). First report of a lipopeptide biosurfactant from thermophilic bacterium *Aneurinibacillus thermoaerophilus* MK01 newly isolated from municipal landfill site. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173, 1236-1249.
- She, Y. H., Zhang, F., Xia, J. J., Kong, S. Q., Wang, Z. L., Shu, F. C. e Hu, J. M. (2011). Investigation of biosurfactant-producing indigenous microorganisms that enhance residue oil recovery in an oil reservoir after polymer flooding. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163, 223-234.
- Shibulal, B., Al-Bahry, S. N., Al-Wahaibi, Y. M., Elshafie, A. E., Al-Bemani, A. S. e Joshi, S. J. (2017). The potential of indigenous *Paenibacillus ehimensis* BS1 for recovering heavy crude oil by biotransformation to light fractions. *PLoS One*, 12, e0171432.
- Singer, M. E. (1985). Microbial biosurfactants. *Microbes Oil Recovery*, 1, 19-38.
- Smyth, T. J. P., Perfumo, A., Marchant, R. e Banat, I. M. (2010). Isolation and analysis of low molecular Miller-Maier ght microbial glycolipids. In *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, pp. 3705-3723. Springer Berlin Heidelberg.
- Sobrinho, H. B., Rufino, R. D., Luna, J. M., Salgueiro, A. A., Campos-Takaki, G. M., Leite, L. F. e Sarubbo, L. A. (2008). Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. *Process Biochemistry*, 43, 912-917.
- Souza, E. C., Vessoni-Penna, T. C. e de Souza Oliveira, R. P. (2014). Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 89, 88-94.
- Tin, T., Fleming, Z. L., Hughes, K. A., Ainley, D. G., Convey, P., Moreno, C. A., Pfeiffer, S., Scott, J. e Snape, I. (2009). Impacts of local human activities on the Antarctic environment. *Antarctic Science*, 21, 3-33.
- Tin, T., Fleming, Z. L., Hughes, K. A., Ainley, D. G., Convey, P., Moreno, C. A., Pfeiffer, S., Scott, J., Snape, I. (2009). Impacts of local human activities on the Antarctic environment. *Antarctic Science*, 21(1), 3-33.
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P. e Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46, 327-338.
- Van Dyke, M. I., Gulley, S. L., Lee, H. e Trevors, J. T. (1993). Evaluation of microbial surfactants for recovery of hydrophobic pollutants from soil. *Journal of Industrial Microbiology*, 11, 163-170.
- Varjani, S. J. e Upasani, V. N. (2017). Critical Review on Biosurfactant Analysis, Purification and Characterization Using Rhamnolipid as A Model Biosurfactant. *Bioresource Technology*.
- Vaz, D. A., Gudiña, E. J., Alameda, E. J., Teixeira, J. A. e Rodrigues, L. R. (2012). Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 89, 167-174.
- Velikonja, J. e Kosaric, N. (1993). Biosurfactants in food applications. *Surfactant Science Series*, 419-419.
- Verma, N., Bansal, M. C., & Kumar, V. (2011). Pea peel waste: a lignocellulosic waste and its utility in cellulase production by *Trichoderma reesei* under solid state cultivation. *BioResources*, 6, 1505-1519.

Wei, F., Wei, X., Zhang, X. e ZHU, G. N. (2005). The Application of Proportional and Bisectional Method to Preparing Emulsifiable Concentrate. *Pesticides-Shenyang-*, 44, 457.

Wei, Q. F., Mather, R. R., e Fotheringham, A. F. (2005). Oil removal from used sorbents using a biosurfactant. *Bioresource technology*, 96(3), 331-334.

Xia, W., Dong, H., Yu, L., Bi, Y., Yu, W. (2016). Analysis of Biosurfactant Production by a New Thermophilic and Halotolerant Bacterium, *Geobacillus* sp. QT. *International Journal of Green Technology*, 2, 20-28.

Yakimov, M. M., Golyshin, P. N., Lang, S., Moore, E. R., Abraham, W. R., Lünsdorf, H. e Timmis, K. N. (1998). *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48, 339-348.

Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., e McInerney, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of microbiological methods*, 56(3), 339-347.

ZoBell, C. E. (1941). Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *J Mar Res*, 4, 42-75.