

ANA BEATRIZ SOUZA PEIXE

**BIOPROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DECEPAS DE
Pseudomonas spp. PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTES.**



**Monografia apresentado 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/2025

**Trabalho realizado no
Departamento de Microbiologia
Geral, do Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes,
UFRJ, sob a orientação do
Professor Mateus Gomes de
Godoy e coorientação de Thiago
Silva de Oliveira.**

CIP - Catalogação na Publicação

P379b Peixe, Ana Beatriz Souza
BIOPROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE
Pseudomonas spp. PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTES /
Ana Beatriz Souza Peixe. -- Rio de Janeiro, 2025.
72 f.

Orientador: Mateus Gomes de Godoy.
Coorientador: Thiago Silva de Oliveira.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2025.

1. Bissurfactante. 2. Biotecnologia. 3.
Pseudomonas. 4. Bioprospecção. I. de Godoy, Mateus
Gomes, orient. II. de Oliveira, Thiago Silva,
coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ

COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ALUNO(A): ANA BEATRIZ SOUZA PEIXE

DRE: 122082728

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Marinella Silva Laport (Presidente)
 Prof. Ana Maria Mazotto de Almeida
 Prof. Carolina Reis Guimarães
 Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius (Suplente)

Título da Monografia: "Bioprospecção e caracterização de cepas de *Pseudomonas* spp. produtoras de biossurfactantes"

Local: Anfiteatro Celuta Sales Alviano, IMPG, CCS, UFRJ

Data e hora de início: 11 de DEZEMBRO de 2025, às 09:00 horas

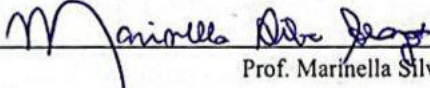
Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 11 de dezembro de 2025.

NOTA:

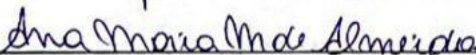
Banca Examinadora:

10



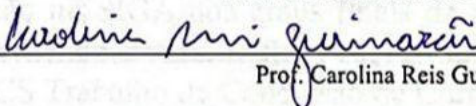
Prof. Marinella Silva Laport (Presidente)

10



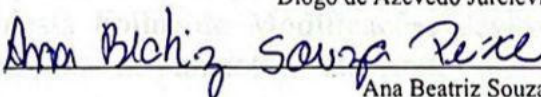
Prof. Ana Maria Mazotto de Almeida

10



Prof. Carolina Reis Guimarães

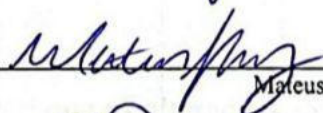
Diogo de Azevedo Jurelevicius (Suplente)



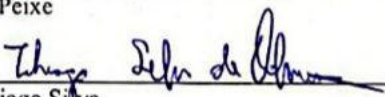
Ana Beatriz Souza Peixe

Aluno(a):

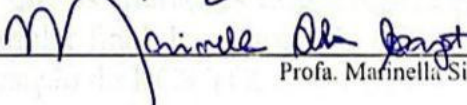
Orientador(a)
(e coorientador):



Mateus Gomes de Godoy e Thiago Silva



Coordenadora de
TCC:



Prof. Marinella Silva Laport

RESUMO

ANA BEATRIZ SOUZA PEIXE

BIOPROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Pseudomonas* spp. PRODUTORAS DE BIOSURFACTANTES.

Orientador: Mateus Gomes de Godoy

Coorientador: Thiago Silva de Oliveira

Os biossurfactantes constituem uma alternativa promissora aos surfactantes sintéticos por serem biodegradáveis, apresentarem baixa toxicidade e possibilitarem aplicação em diversos setores industriais, farmacêutico, alimentício e de limpeza. Diante da crescente demanda por compostos sustentáveis e eficientes, este trabalho teve como objetivo isolar, identificar e caracterizar cepas de *Pseudomonas* provenientes de praia e cachoeira do Rio de Janeiro, bem como avaliar seu potencial para a produção de biossurfactantes. Para isso, foi realizada inicialmente o isolamento e identificação bacteriana por espectrometria de massas MALDI-TOF, seguida da confirmação taxonômica por sequenciamento do gene *rrs*, codificador do 16S rRNA, assegurando maior precisão na delimitação das espécies. Além disso, foi empregada a técnica de ERIC-PCR para tipagem molecular, para identificar possíveis cepas clonais. Foram isoladas o total de 95 cepas bacterianas e a partir do processo de triagem, foram obtidas 12 cepas de *Pseudomonas*, das quais três apresentaram perfis genéticos idênticos no ERIC-PCR, indicando clonalidade. Para investigar o potencial biossurfactante das cepas isoladas, foram utilizados três meios de cultura para produção de biossurfactante. A capacidade tensoativa dos biossurfactantes foi avaliada por meio da redução da tensão superficial e por testes de índice de emulsificação (IE), empregando dois óleos (óleo de soja e n-hexadecano). Os resultados demonstram que o meio MSM3 foi o mais eficiente na produção de biossurfactante capaz de reduzir a tensão superficial, concentrando as amostras que apresentaram os menores valores observados o que indica maior produção de compostos com forte capacidade de redução de tensão. Em contrapartida, o biossurfactante produzidos nos meios MSM1 e MSM2 demonstraram melhor desempenho no potencial emulsificante, especialmente quando avaliado com óleo de soja. O biossurfactante produzido no meio MSM2 destacou-se pela maior consistência entre as triplicatas e pelos maiores índices

emulsificação, com valores predominantemente entre 45% e 51%, indicando boa estabilidade das emulsões formadas. A análise utilizando n-hexadecano revelou maior variabilidade e menor reprodutibilidade, particularmente o biossurfactante produzido no meio MSM3. Apesar dessas variações, todas as cepas demonstraram algum grau de emulsificação em pelo menos uma das condições testadas, apresentando um potencial biossurfactante com atividade emulsificante. A comparação entre os biossurfactantes produzidos nos três meios de cultivo evidenciou diferenças significativas nos perfis de produção das cepas isoladas, destacando que a síntese, a estabilidade e o comportamento das moléculas produzidas são altamente influenciados pela composição nutricional e pelo tipo de substrato hidrofóbico empregado na avaliação. De forma geral, os resultados permitem concluir que o biossurfactante produzido pela cepa *Pseudomonas wayambapalatensis* SDA8 no meio MSM3 é o mais indicado para estudos que visam maximizar a redução da tensão superficial, enquanto MSM1 e MSM2 se mostram mais adequados para a produção de biossurfactantes com maior estabilidade emulsificante, especialmente com óleo de soja como fase hidrofóbica. O estudo contribuiu para a seleção de isolados promissores para produção de biossurfactantes.

Palavras-chave: Bioprospecção; Biossurfactantes; *Pseudomonas*; Surfactantes.

ABSTRACT**ANA BEATRIZ SOUZA PEIXE****BIOPROSPECTING AND CHARACTERIZATION OF *Pseudomonas* spp. STRAINS PRODUCING BIOSURFACTANTS.****Orientador: Mateus Gomes de Godoy****Coorientador: Thiago Silva de Oliveira**

Biosurfactants constitute a promising alternative to synthetic surfactants due to their biodegradability, low toxicity, and broad applicability across several industrial sectors, including bioremediation, pharmaceutical, food, and cleaning industries. In view of the growing demand for sustainable and efficient compounds, this study aimed to isolate, identify, and characterize *Pseudomonas* strains from beach and waterfall environments in Rio de Janeiro, as well as to evaluate their potential for biosurfactant production. Initially, bacterial isolation and identification were performed using MALDI-TOF mass spectrometry, followed by taxonomic confirmation through sequencing of the *rrs* gene, which encodes 16S rRNA, ensuring greater accuracy in species delimitation. In addition, ERIC-PCR was employed for molecular typing to identify possible clonal strains. A total of 95 bacterial strains were isolated, and after the screening process, 12 *Pseudomonas* strains were obtained, three of which showed identical genetic profiles by ERIC-PCR, indicating clonal relatedness. To investigate the biosurfactant-producing potential of the isolated strains, three different culture media (MSM1, MSM2, and MSM3), formulated with distinct nutritional compositions (Annex 2), were used. The surface-active capacity of the biosurfactants was evaluated through surface tension reduction and emulsification index (EI) assays, using two hydrophobic substrates: soybean oil and *n*-hexadecane. The results demonstrated that MSM3 was the most efficient medium for producing biosurfactants capable of reducing surface tension, as it concentrated the samples that exhibited the lowest values observed, indicating a higher production of compounds with strong surface tension-reducing capacity. In contrast, biosurfactants produced in MSM1 and MSM2 showed better performance in emulsifying activity, particularly when evaluated with soybean oil. The biosurfactant produced in MSM2 stood out due to its greater consistency among triplicates and higher emulsification indices, with values predominantly ranging from 45% to 51%, indicating good stability of the formed emulsions. Analysis using *n*-hexadecane revealed greater variability and lower reproducibility, particularly for the biosurfactant produced in MSM3. Despite these variations, all strains demonstrated some degree of emulsification under at least one of the

tested conditions, indicating biosurfactant potential with emulsifying activity. Comparison of the biosurfactants produced in the three culture media highlighted significant differences in the production profiles of the isolated strains, emphasizing that the synthesis, stability, and behavior of the molecules produced are highly influenced by nutritional composition and the type of hydrophobic substrate used in the evaluation. Overall, the results allow the conclusion that the biosurfactant produced by *Pseudomonas wayambapalatensis* SDA8 in MSM3 is the most suitable for studies aimed at maximizing surface tension reduction, whereas MSM1 and MSM2 are more appropriate for the production of biosurfactants with greater emulsifying stability, especially when soybean oil is used as the hydrophobic phase. This study contributed to the selection of promising isolates for biosurfactant production.

Key-words: Bioprospecting; Biosurfactants; *Pseudomonas*; Surfactants.

RESUMO PARA LEIGOS**ANA BEATRIZ SOUZA PEIXE****ESTUDO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Pseudomonas* PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTES.****Orientador: Mateus Gomes de Godoy****Coorientador: Thiago Silva de Oliveira**

Os biossurfactantes são substâncias produzidas por microrganismos que funcionam como “sabões naturais”. Eles chamam atenção por serem menos poluentes, menos tóxicos e por terem várias aplicações possíveis, como na limpeza, na indústria de alimentos, em cosméticos e até na recuperação de áreas contaminadas. Neste trabalho, o objetivo foi encontrar e estudar bactérias do gênero *Pseudomonas*, coletadas em uma cachoeira e em uma praia do Rio de Janeiro, para descobrir se elas conseguem produzir esse tipo de composto. Primeiro, as bactérias foram isoladas e identificadas por meio de técnicas modernas que permitem saber exatamente qual espécie está sendo analisada. Depois, também foi estudado o DNA dessas bactérias para confirmar essa identificação e verificar se algumas delas eram geneticamente muito parecidas, o que significa que podem ser “clones”. Ao final dessa etapa, foram obtidas 12 bactérias diferentes do gênero *Pseudomonas*, e três delas se mostraram ser clones. Para testar se essas bactérias eram capazes de produzir biossurfactantes, elas foram cultivadas em três tipos diferentes de meios de crescimento. A ideia era ver se elas conseguiam reduzir a tensão superficial da água, algo parecido com o que o sabão faz, e se elas eram capazes de emulsificar óleos, ou seja, misturar óleo e água de forma estável. Para isso, foram testados dois óleos: óleo de soja e *n*-hexadecano. Os resultados mostraram que uma das cepas isoladas e foi a melhor para diminuir a tensão da água, no meio de cultura MSM3 indicando que ele ajuda as bactérias a produzirem moléculas mais fortes nesse sentido. Já os meios MSM1 e MSM2 foram melhores para formar emulsões estáveis, principalmente quando o óleo usado era o de soja. Em geral, todas as bactérias apresentaram algum tipo de atividade relacionada à produção de biossurfactantes, mesmo que em níveis diferentes. Essas diferenças entre os meios de cultivo mostram que a forma como o microrganismo é alimentado influencia muito no tipo e na quantidade de biossurfactante produzido. No final, foi possível concluir que o meio MSM3 é o mais indicado quando o objetivo é reduzir a tensão superficial, enquanto MSM1 e MSM2 são melhores para quem busca biossurfactantes com maior capacidade de emulsificação. O estudo ajuda a identificar quais bactérias são mais promissoras e quais condições favorecem sua produção, servindo

como base para pesquisas futuras que envolvam a purificação, caracterização e aplicação industrial desses biossurfactantes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Surfactantes	12
1.2 Aplicações industriais dos surfactantes	14
1.3 Toxicidade dos surfactantes químicos	15
1.4 Biossurfactantes	16
1.4.1 Rhamnolipídeos	19
1.5 Bioprospecção de <i>Pseudomonas</i> produtoras de biossurfactantes	23
1.6 Mercado dos biossurfactantes	24
2. JUSTIFICATIVA	26
3.0 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivos gerais	28
3.2 Objetivos específicos	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Isolamento e obtenção das cepas	29
4.2 Caracterização morfológica de colônias	31
4.3 Coloração de Gram	31
4.4 Identificação das bactérias por espectrometria de massa MALDI-TOF (<i>Matrix Assisted Laser Desorption/ionization - Time of flight</i>).	32
4.5 Produção do biossurfactante	33
4.5.2 Processo de obtenção do biossurfactante	34
4.6 Avaliação das atividades tensoativas para triagem	35
4.6.1 Avaliação da capacidade emulsificante	35
4.6.2 Avaliação da tensão superficial	36
4.7 Identificação pelo sequenciamento do gene <i>rrs</i> , codificador da subunidade 16s	36
4.8 Tipagem molecular por <i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i> – PCR (ERIC-PCR)	37
5. RESULTADOS	39
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÕES	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1.INTRODUÇÃO

1.1 Surfactantes

Surfactantes são moléculas anfipáticas, ou seja, elas possuem uma porção hidrofóbica apolar e outra hidrofílica polar (Figura 1). Essa característica concede a molécula um caráter tensoativo, permitindo que se distribua nas interfaces fluidas, que podem apresentar diferentes graus de polaridade (Veeramanoharan *et al.*, 2024). Desse modo, os surfactantes possuem a capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido, além de conferir solubilidade em solventes polares e apolares (Daltin, 2011; Fábio *et al.*, 2007).

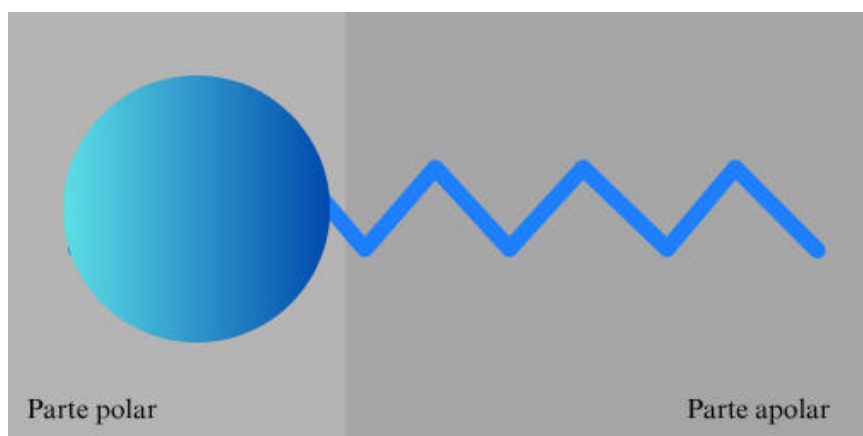


Figura 1. Representação esquemática de uma molécula de tensoativo com suas partes polar e apolar.
(autoria própria)

A porção apolar é frequentemente composta por uma cadeia hidrocarbonada, responsável pela solubilidade em substâncias apolares, como óleos. Por sua vez, a porção polar é composta por grupos hidrofílicos, como carboxilatos, sulfonatos, sulfatos ou grupos etoxilados, que permitem a interação com a água. Essa porção é responsável pela classificação dos surfactantes, de acordo com a sua carga, podendo apresentar caráter iônico (aniônico ou catiônico), não-iônico ou anfotérico, sendo essa porção responsável pela solubilidade em água (Nitschke *et al.*, 2002; Saini *et al.*, 2024).

Em uma solução, as moléculas de água estão constantemente interagindo por meio de forças intermoleculares, estabelecendo uma atração balanceada no interior do líquido entre as moléculas vizinhas, que forma uma força vetorial de atração nula. No entanto, as moléculas localizadas nas interfaces (líquido-ar e líquido-líquido) vão apresentar uma atração desbalanceada, de forma que essas moléculas vão sofrer uma força orientada para o interior do líquido (Brigodiot *et al.*, 2024). Esse desbalanço leva a formação de uma força

perpendicular a superfície, denominada como a tensão superficial, conferindo a característica de resistência da superfície do líquido e formação de gotas (Daltin, 2011).

As propriedades funcionais dos surfactantes decorrem da capacidade dessas moléculas de se acumular na interface e de se intercalar entre as moléculas já presentes. Esse processo reduz a força de atração entre elas, resultando assim na diminuição da tensão superficial e interfacial (Holmberg *et al.*, 2002; Shaban *et al.*, 2020). Dessa forma, os surfactantes atuam promovendo a emulsificação, processo no qual duas fases imiscíveis são estabilizadas pela redução da tensão interfacial, permitindo a formação e manutenção de emulsões. Essa propriedade é determinada pela intensidade das forças de atração entre as moléculas situadas na interface das fases. Quando em uma solução contendo fases imiscíveis, como por exemplo a água e óleo, a parte hidrofílica (polar) interage com a fase aquosa, e a parte hidrofóbica (apolar) se solubiliza na fase oleosa (Daltin, 2011; Niroobakhsh *et al.*, 2019).

Quando em solução, no momento em que a fase líquido-líquido é completamente ocupada pelo tensoativo, as moléculas excedentes tendem a se agrupar na interface líquido-ar. Quando todas essas superfícies já estão saturadas e ainda resta surfactante livre, ele tende a se posicionar nas paredes do recipiente criando uma interface sólido-líquido. Caso ainda haja moléculas livres e parcialmente estáveis, que não encontrem opções de adsorção nas superfícies disponíveis, ou seja, quando as superfícies se tornam saturadas elas irão se organizar em micelas (Salager *et al.*, 1993; Ghosh *et al.*, 2020; Barbosa *et al.*, 2022).

As micelas são estruturas mais estáveis do que o tensoativo livre e são responsáveis pela solubilização de substâncias hidrofóbicas insolúveis em água, caracterizando a capacidade de emulsão dos tensoativos. Em solução aquosa, essas estruturas se organizam com a porção lipofílica voltada para o interior da micela, enquanto em meio oleoso é a parte hidrofílica que ocupa esse espaço. Dessa forma, os tensoativos desempenham um papel fundamental na formação e estabilização de emulsões, promovendo a dispersão homogênea de líquidos imiscíveis (Berry *et al.*, 2015).

A concentração na qual ocorre a formação de micelas é denominada concentração micelar crítica (CMC), sendo uma propriedade específica de cada tensoativo, mas que também pode ser influenciada por fatores externos, como a natureza do solvente, temperatura, pH e força iônica da solução. (Mabrouk *et al.*, 2023). A partir da CMC, o aumento da concentração de tensoativo não provoca mais redução da tensão superficial,

uma vez que a interface líquido-ar já está completamente ocupada de forma que novas moléculas de surfactante não poderão preencher a superfície (Figura 2) (Daltin, 2011).

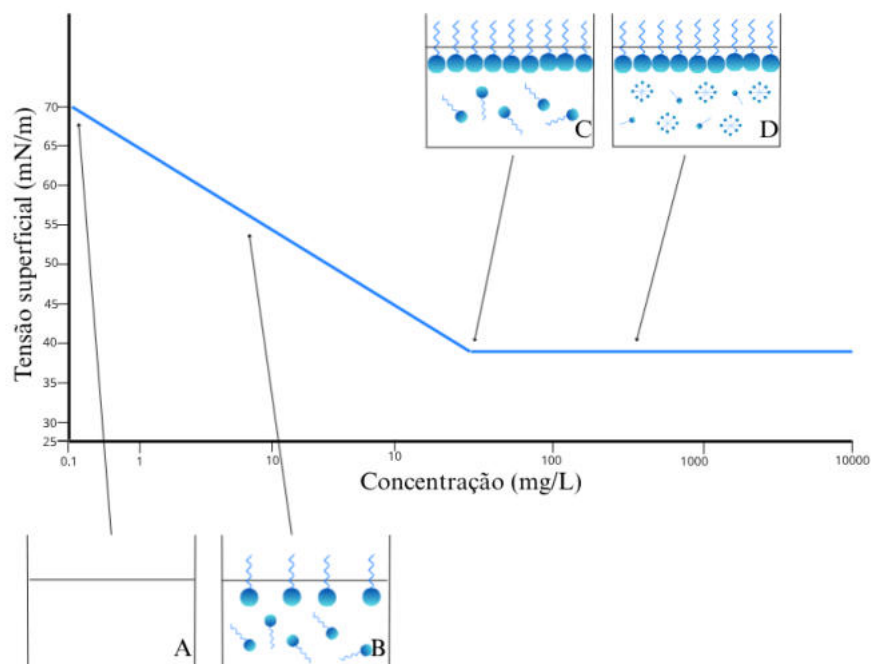


Figura 2. Esquema representativo do comportamento do tensoativo entre as fases fluida e superficial, em função da tensão superficial, indicando a CMC. (A) Baixa concentração de tensoativo, sem redução significativa da tensão superficial. (B) Moléculas começam a se posicionar na interface ar-líquido, reduzindo a tensão superficial. (C) Saturação da interface. A tensão superficial atinge seu valor mínimo próximo à CMC. (D) Formação de micelas no meio. A partir da CMC, a tensão superficial se estabiliza, e as moléculas excedentes formam estruturas micelares. (autoria própria)

1.2 Aplicações industriais dos surfactantes

Devido as suas propriedades anfífilas, os surfactantes (ou tensoativos) são amplamente empregados em diversos setores industriais (Saini *et al.*, 2024). Um dos fatores que norteiam a utilização dos surfactantes em determinada classificação é a carga da porção polar (Daltin, 2011). Os tensoativos aniônicos são a classe mais utilizada, principalmente pela sua grande aplicação na indústria de detergentes devido a sua alta capacidade de limpeza e formação de espumas, além disso também são utilizados como agentes molhantes e emulsificantes (Jozanović *et al.*, 2021). Por sua vez, os tensoativos catiônicos são mais frequentemente empregados como amaciantes de tecidos, agentes antiestáticos, produtos para o cabelo, inibidores de corrosão, dispersantes de partículas e emulsificantes, além de possuir atividade antimicrobiana (Gonçalves *et al.*, 2023).

Os surfactantes anfotéricos possuem grupos carregados positivamente e negativamente na mesma molécula, sendo muito versáteis e abundantes, podendo ser

aplicados na indústria alimentícia como emulsificante alimentar em produtos como maionese e em muitos produtos de cuidados pessoais, como shampoos e sabonetes líquidos (Sarkar *et al.*, 2021). Por fim, os surfactantes não iônicos são geralmente utilizados em alimentos (como margarina e sorvete), produtos farmacêuticos e cosméticos. Sua principal vantagem reside na sua compatibilidade com outros tipos de surfactantes e na baixa toxicidade, o que os torna ideais para aplicações em contato com a pele e para consumo (Hayes *et al.*, 2019; Khan, *et al.*, 2022).

No setor agrícola, por exemplo, eles são essenciais na formulação de nanoemulsões que funcionam como veículos para agentes fitossanitários com atividade inseticida. Além disso, contribuem para a biorremediação de solos contaminados por agrotóxicos (Silva *et al.*, 2025). Nas indústrias farmacêutica e de cosméticos, esses compostos são fundamentais na fabricação de produtos de higiene pessoal, cuidados com a pele e na formulação de fármacos (Bhattacharya *et al.*, 2017). Adicionalmente, na indústria petrolífera, a aplicação de surfactantes abrange desde as operações de perfuração até o tratamento do petróleo. Isso se justifica pelo fato de que o petróleo bruto é frequentemente extraído na forma de uma emulsão de água em óleo, tornando a ação dos surfactantes crucial para a quebra dessa emulsão e o subsequente processamento do produto (Salager *et al.*, 2019).

1.3 Toxicidade dos surfactantes químicos

Devido a sua ampla aplicação em diversos setores industriais, como citado anteriormente, os surfactantes químicos são utilizados em grandes volumes. Essa utilização se estende até a utilização para a higienização, tanto no meio industrial quanto doméstico (Nunes *et al.*, 2022). Cerca de 60% desses compostos utilizados são liberados no ambiente aquático após o uso, correspondendo a aproximadamente sete milhões de toneladas desses compostos lançadas anualmente no meio ambiente em escala global (Arora *et al.*, 2023a). Diante desse cenário torna-se necessária uma atenção especial à toxicidade desse composto, devido aos potenciais impactos ambientais associados ao seu acúmulo nos ecossistemas aquáticos.

A origem desses compostos tensoativos é a principal problemática ambiental relacionada ao uso extensivo dos surfactantes, visto que a maioria desses compostos são derivados de fontes não renováveis e não biodegradáveis como o petróleo. Além disso, a natureza anfipática dessas moléculas permite que elas atuem como agentes carreadores, formando micelas que encapsulam e facilitam a disseminação de poluentes

hidrofóbicos e de substâncias como metais pesados. Este aumento na mobilidade dos contaminantes representa um risco toxicológico ampliado e persistente para a biota local, causando danos adicionais ao ecossistema (Saxena *et al.*, 2023).

Outra problemática relacionada ao uso desses compostos químicos é a formação de espumas. Essas espumas dificultam a autodepuração natural dos efluentes (Arora *et al.*, 2023b). Além disso, contribuem para a formação de película isolante na superfície da água, o que reduz a concentração de oxigênio dissolvido. Esses compostos também apresentam alta toxicidade direta aos organismos aquáticos presentes nos corpos hídricos que recebem os efluentes. Esses fatores, portanto, contribuem para o desequilíbrio ecológico (Cunha *et al.*, 2000).

Levando em consideração a utilização de tensoativos em produtos de higiene, beleza e limpeza, é comum que esses compostos sejam manipulados com as mãos desprotegidas. Isso gera preocupações em relação aos efeitos dermatológicos causados por esses agentes, como por exemplo reações alérgicas e irritações cutâneas de diferentes graus. Esses casos podem ser provocados tanto pela penetração dos compostos na pele quanto pela ação das micelas, que removem a camada de gordura protetora da epiderme (Daltin, 2011; Salomon *et al.*, 2022).

Por ser um produto derivado do petróleo, a escassez de recursos petroquímicos é associada ao alto custo e à instabilidade do mercado desses insumos. Além disso, sabendo da alta toxicidade desses compostos e com o objetivo de mitigar os impactos da poluição aquática e ambiental, tem-se observado uma demanda crescente por produtos biodegradáveis (Mgbechidinma *et al.*, 2022). Esses produtos são desenvolvidos com base nos princípios da sustentabilidade e visam reduzir os efeitos negativos sobre o meio ambiente (Wang *et al.*, 2021). A pesquisa científica tem se voltado, cada vez mais, para o aproveitamento de fontes biológicas, naturais e renováveis tendo como objetivo viabilizar a produção de compostos mais sustentáveis. Neste contexto, a busca por alternativas mais ecologicamente responsáveis levou ao estudo e desenvolvimento dos biossurfactantes, que se apresentam como uma promissora alternativa ao uso dos surfactantes químicos (Veeramanoharan e Kim, 2024).

1.4 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são compostos tensoativos produzidos por microrganismos, sendo produtos das atividades metabólicas de bactérias, leveduras e fungos filamentosos

(Madaki e Rabi'u, 2025). Assim como suas contrapartes sintéticas, os biossurfactantes apresentam uma estrutura típica formada por uma região hidrofóbica, geralmente compostas por cadeias de hidrocarboneto de um ou mais ácidos graxos que podem ser saturadas, insaturadas, hidroxiladas ou ramificadas. Por sua vez, a região hidrofílica dos tensoativos pode incluir grupos químicos como ésteres, hidroxilas, fosfatos, aminoácidos ou carboidratos (Kubicki *et al.*, 2019).

Devido a essa natureza biológica, esses compostos possuem formas e estruturas diversas, fazendo com que possa atender atividades específicas (Otzen, 2017; Farias *et al.*, 2021). Sendo assim, os biossurfactantes são potenciais alternativas ao uso dos surfactantes químicos nos processos industriais e podem ser aplicados com sucesso em diversas áreas (Quadro 1).

Quadro 1. Principais aplicações industriais dos biossurfactantes.

Funções	Campos de aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos e alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e produtos de limpeza
Detergentes	Agricultura, limpeza doméstica e industrial
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e bebidas
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Formadores de vesículas	Nanotecnologia e cosméticos
Fator de crescimento microbiano	Biotechnology e fermentação industrial
Demulsificantes	Tratamento de efluentes e recuperação de petróleo
Dispersantes	Formulações farmacêuticas
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR)

Adaptado de Saini *et al.*, 2024.

A principal aplicação dos biossurfactantes está no setor de recuperação avançada de petróleo (EOR) e na remediação ambiental. Na EOR, são utilizados para reduzir a tensão interfacial entre as fases óleo e água/rocha, o que é essencial para superar as forças capilares que retêm o petróleo nos reservatórios e promover sua extração (Xi *et al.*, 2021). Além disso, surge como tecnologia emergente na biorremediação de solos contaminados, sua função é aumentar a biodisponibilidade de contaminantes hidrofóbicos (como hidrocarbonetos e metais pesados) para os microrganismos por meio da solubilização micelar (acima da CMC), que encapsula os poluentes, e da mobilização dos contaminantes do solo e da água, facilitando sua degradação e remoção dos ecossistemas (Sun *et al.*, 2019).

Na indústria alimentícia, atuam como agentes emulsificantes e estabilizantes naturais em produtos como maionese e sorvetes, visando a substituição de aditivos sintéticos (Ribeiro *et al.*, 2020). Na indústria farmacêutica, são exploradas a atividade antimicrobiana (antifúngica, antibacteriana) e, sobretudo, anti-adesiva, sendo cruciais na inibição da formação de biofilmes por patógenos (Adnan *et al.*, 2021). Na nanotecnologia, são valorizados como agentes estabilizantes e dispersantes ecologicamente corretos na síntese de diversas nanopartículas, consolidando seu papel em múltiplas frentes de desenvolvimento tecnológico e sustentável (Femina *et al.*, 2024).

Além das aplicações industriais, os biossurfactantes possuem funções fisiológicas muito importante para os microrganismos que os produzem (Ceresa *et al.*, 2023). Uma das principais funções é a solubilização e emulsificação de compostos hidrofóbicos, como hidrocarbonetos, permitindo que os microrganismos utilizem esses substratos como fonte de carbono (De Clercq *et al.*, 2021). Além disso, os biossurfactantes também atuam na modulação de biofilmes, tanto na formação quanto na dispersão dessas estruturas que são importantes para a proteção das comunidades microbianas no meio ambiente (Sharma *et al.*, 2021). Essas moléculas também podem possuir propriedades antimicrobianas, antivirais e imunomodulatórias, contribuindo para a defesa do microrganismo produtor contra competidores e patógenos (Varjani e Upasani, 2017).

Considerando suas funções biológicas e sua relevância ecológica, os biossurfactantes apresentam certas vantagens quando comparados aos surfactantes químicos (Pardhi *et al.*, 2022; Van Hamme *et al.*, 2006). Entre elas, destacam-se: maior biodegradabilidade, o que permite sua rápida degradação na água e no solo; maior estabilidade em condições extremas de temperatura e concentração de sais, que normalmente inativam surfactantes convencionais; biocompatibilidade; maior atividade superficial e interfacial em baixas concentrações; além de maior biodisponibilidade e aceitação ecológica (Abbot *et al.*, 2022). Sendo assim, atualmente os biossurfactantes estão recebendo grande atenção por serem compostos mais sustentáveis e ecologicamente corretos.

Os biossurfactantes podem ser classificados de acordo com o tipo de grupamento hidrofílico da molécula. As principais classes incluem: glicolipídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos, surfactantes particulados e surfactantes poliméricos, que

podem ser produzidos por diferentes grupos de microrganismos (Quadro 2) (Madak *et al.*, 2025; Nitschke *et al.*, 2002; Otzen, 2017).

Quadro 2. Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos.

Classe de Biossurfactante	Microrganismos produtores	Referência
Glicolipídeos		
Ramnolipídeo	<i>Pseudomonas putida</i>	(Biktasheva et al., 2022) (Roberto De Oliveira et al.,2-015) (Tadayon Tajabadi et al., 2023)
Soforolipídeo	<i>Starmerella bombicola</i>	
Tralolipídeo	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	
Lipopeptídeo		
Surfactina	<i>Bacillus velezensis</i>	(Guimarães et al., 2021)
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	(Alsohim et al., 2014)
Polimixina	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	(Kubicki et al., 2019)
Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios		
Lipídeos neutros	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	(Tadayon Tajabadi et al., 2023)
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>	
Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	
Surfactantes poliméricos		
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	(Tadayon Tajabadi et al., 2023)
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	
Liposan	<i>Yarrowia lipolytica</i>	

Os glicolipídios e os lipopeptídeos representam as classes de biossurfactante mais estudadas recentemente, principalmente devido a sua alta capacidade de reduzir a tensão superficial (Dini *et al.*, 2024; Sałek *et al.*, 2022). Além disso, essas classes têm sido descritas como potenciais agentes biocidas, podendo evitar a colonização de bactérias e a formação de biofilmes (Dardouri *et al.*, 2021). Entre os glicolipídeos, os ramnolipídeos se destacam por sua expressiva eficácia significativa na redução da tensão e por sua versatilidade de aplicação, especialmente em formulações antimicrobianas e no processo de limpeza de superfícies contaminadas (Thakur *et al.*, 2021).

1.4.1 Ramnolipídeos

Os ramnolipídeos são biossurfactantes pertencentes à classe dos glicolipídeos e são reconhecidos por suas propriedades tensoativas excelentes (Drakontis e Amin,

2020). Eles são caracterizados por uma porção hidrofóbica composta por uma, duas ou até três cadeias de ácidos graxos, com comprimento variando entre 8 e 16 carbonos (Tiso *et al.*, 2017). Já a fração hidrofílica é formada por unidades de ramnose, podendo conter uma ou duas unidades de ramnose unidas por uma ligação glicosídica, sendo classificados, respectivamente, como mono e di-ramnolipídeos (Figura 3) (Dardouri *et al.*, 2021).

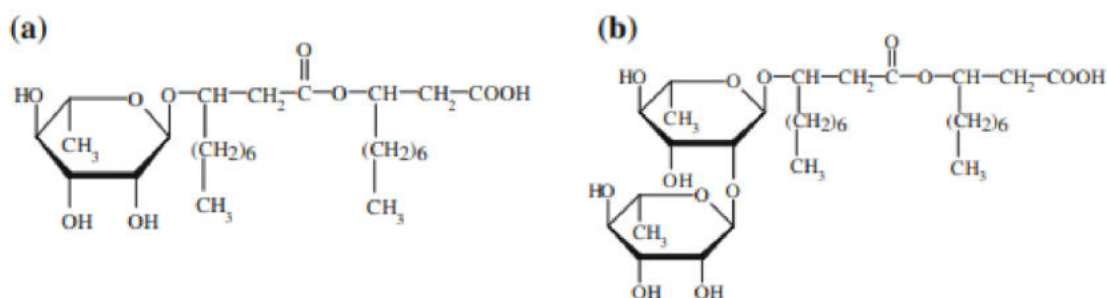


Figura 3. Estruturas de (A) mono-ramnolipídeos e (B) di-ramnolipídeos. Adaptada de Jahan *et al.*, 2020.

A produção de ramnolipídeos é fortemente influenciada por fatores físico-químicos, como pH, temperatura, agitação e disponibilidade de oxigênio (Eslami *et al.*, 2020). Essas variáveis exercem um papel modulador no crescimento e na atividade celular, impactando diretamente a quantidade e a qualidade dos biossurfactantes produzidos (Blunt *et al.*, 2022). Além disso, a concentração de nutrientes essenciais, como carbono, nitrogênio, fósforo e manganês, constitui outro fator crítico na síntese desses tensoativos (Varjani e Upasani, 2017).

A estrutura dos ramnolipídeos também desempenha um papel determinante em suas propriedades físico-químicas e aplicações. Características como o número de resíduos de ramnose e o comprimento das cadeias de ácidos graxos influenciam diretamente sua bioatividade e comportamento superficial (Wittgens *et al.*, 2018). Em função dessas características estruturais, os ramnolipídeos apresentam eficiência de redução da tensão superficial comparável à de surfactantes químicos. Enquanto a água pura possui tensão superficial de aproximadamente 72 mN/m, esses biossurfactantes podem reduzi-la para cerca de 30 mN/m (Mohanty *et al.*, 2021).

Além disso, os ramnolipídeos exibem valores de concentração micelar crítica (CMC) consideravelmente menores que muitos surfactantes sintéticos, variando entre 6,5 mg/L e 200 mg/L, dependendo do tipo de ramnolipídeo e das condições ambientais, como pH, temperatura e agitação (Hayes e Solaiman, 2019). Essas propriedades

contribuem para suas destacadas capacidades detergentes, emulsificantes e dispersantes, tornando-os alternativas promissoras para diversas aplicações industriais e ambientais (Varjani e Upasani, 2017).

Além do desempenho físico-químico, os ramnolipídeos se destacam por sua atividade biológica. Seu mecanismo de ação sobre membranas celulares confere forte atividade antimicrobiana, atuando na desestabilização da bicamada lipídica, aumento da permeabilidade e eventual lise celular, sendo eficazes contra bactérias, fungos e biofilmes (Płaza e Achal, 2020; Abdel-Mawgoud *et al.*, 2009). Em paralelo, sob condições adequadas, esses biossurfactantes apresentam baixa toxicidade e boa biocompatibilidade, favorecendo sua utilização em formulações cosméticas, farmacêuticas e biomédicas (Ceresa *et al.*, 2023; Simms *et al.*, 2023).

Por fim, aplicações mais recentes têm explorado o potencial dos ramnolipídeos como agentes na remoção de biofilmes em equipamentos médicos (Parreira *et al.*, 2015). Ademais, sua capacidade de formar micelas, vesículas e outras estruturas supramoleculares os posiciona como candidatos promissores para uso em nanotecnologia, ampliando ainda mais seu leque de aplicações em sistemas sustentáveis e inovadores (Marchant e Banat, 2012).

1.5.1 Bactérias do gênero *Pseudomonas*

As bactérias do gênero *Pseudomonas* pertencem ao grupo das bactérias Gram-negativas, aeróbias, metabolicamente versáteis e amplamente distribuídas em diferentes ambientes naturais, como solos, águas doces, ambientes marinhos e superfícies associadas a plantas e animais (Silby *et al.*, 2011). Esse gênero se destaca pela elevada capacidade de adaptação a condições ambientais adversas, resultado de seu amplo repertório metabólico, que permite a utilização de diversos compostos orgânicos como fonte de carbono e energia (Saati *et al.*, 2022). Além disso, espécies de *Pseudomonas* apresentam grande relevância biotecnológica e ambiental, sendo reconhecidas pela produção de metabólitos de interesse, como enzimas, pigmentos, antibióticos e biossurfactantes, bem como pelo seu papel em processos de biorremediação. Devido a essas características, o gênero *Pseudomonas* tem sido amplamente estudado em diferentes áreas da microbiologia, especialmente em pesquisas voltadas ao desenvolvimento de soluções sustentáveis e aplicações industriais (Chauhan *et al.*, 2023).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são consideradas as principais produtoras de biossurfactantes do tipo ramnolipídeo. Dentro desse gênero, a espécie *Pseudomonas aeruginosa*, embora patogênica, é a mais estudada e reconhecida pela sua elevada eficiência na produção desses compostos (Chang *et al.*, 2021). No entanto, a síntese de ramnolipídeos não se restringe a essa espécie, podendo também ser realizada por outras espécies do gênero *Pseudomonas* (Quadro 3). Os ramnolipídeos produzidos por esse gênero bacteriano podem apresentar diferentes homólogos, sendo o mono-ramnolipídeo o produto predominante. Essa predominância é relevante, pois esse tipo de estrutura impacta significativamente a eficiência do tensoativo. De modo geral, os mono-ramnolipídeos apresentam menor CMC e maior capacidade de solubilização micelar do que os di-ramnolipídeos (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2009; Wittgens *et al.*, 2018).

Quadro 3. Algumas espécies de *Pseudomonas* descritas como produtoras de ramnolipídeos

Espécie	Tipo de ramnolipídeo	Referência
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Mono-RL com C10-C8, C10-C10, C12-C10, C12:1-C10, C12-C12,	Wittgens <i>et al.</i> 2017
<i>Pseudomonas putida</i>	RLa (congenero não identificado)	Tiso <i>et al.</i> , 2016
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	RLa (congenero não identificado)	Sharma <i>et al.</i> , 2014
<i>Pseudomonas monteilii</i>	RLa (congenero não identificado)	Kumari <i>et al.</i> , 2022

Adaptada de Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são constantemente descritas em processos biotecnológicos em diferentes áreas de pesquisa (Chauhan *et al.*, 2023). Como por exemplo, na biocatálise industrial, plataforma de produção de proteínas recombinantes e controle biológico na agricultura (Liu *et al.*, 2022; Nikel e de Lorenzo, 2018; Retallack *et al.*, 2012). Além disso, elas possuem uma grande flexibilidade fisiológica, podendo se adaptar a diferentes níveis de condições ambientais (Cui *et al.*, 2023). Essas bactérias são capazes de crescer em uma ampla faixa de temperatura, geralmente entre 4°C e 42°C, além de tolerarem variações moderadas de pH, desenvolvendo-se bem entre pH 6,0 e 8,0. Também suportam diferentes níveis de pressão osmótica, incluindo concentrações salinas de até 3 – 4% de NaCl (Muslu *et al.*, 2020).

Outra característica importante que leva essas bactérias a serem amplamente exploradas na pesquisa é a sua versatilidade metabólica. As *Pseudomonas* possuem a capacidade de utilizar ampla gama de substâncias orgânicas como fonte nutricional. Além disso, esses compostos podem atuar como precursores na produção de metabólitos

secundários reconhecidos como potenciais produtos biotecnológicos (Craig *et al.*, 2021; Orellana-Saez *et al.*, 2019).

1.5.2 Bioprospecção de *Pseudomonas* produtoras de biossurfactantes

A bioprospecção de microrganismos capazes de produzir biossurfactantes tem ganhado crescente relevância devido ao potencial desses compostos em processos industriais, ambientais e biotecnológicos (Cerqueira dos Santos *et al.*, 2024). Como mencionado anteriormente, bactérias do gênero *Pseudomonas* destacam-se pela elevada versatilidade metabólica e pela ampla capacidade de síntese de biossurfactantes, especialmente do tipo ramnolípido. O isolamento de novas cepas permite a identificação de variantes com maior eficiência de produção, estabilidade em diferentes condições ambientais e perfis estruturais diferenciados, o que pode ampliar o espectro de aplicações desses compostos (Ghazi Faisal *et al.*, 2023a).

A busca por novas linhagens produtoras também é fundamental para superar limitações associadas às cepas convencionalmente utilizadas, como a patogenicidade da *Pseudomonas aeruginosa*. Nesse contexto, o isolamento de *Pseudomonas* spp. provenientes de ambientes como solo e água oferece uma estratégia eficaz para encontrar novos microrganismos que apresentem menor patogenicidade (Kumar *et al.*, 2021).

Entre as espécies mais promissoras, destacam-se *Pseudomonas chlororaphis* e *Pseudomonas putida*. A *P. chlororaphis* é reconhecida pela capacidade de produzir compostos bioativos e biossurfactantes associados ao controle biológico, além de apresentar bom desempenho na emulsificação de hidrocarbonetos e na biorremediação (Karaś *et al.*, 2023). Já *P. putida* é amplamente explorada na biotecnologia devido à sua robustez fisiológica, facilidade de cultivo e de metabolizar compostos hidrofóbicos, tornando-a uma candidata ideal para a produção de biossurfactantes e para processos de degradação de poluentes orgânicos (Michalska *et al.*, 2020).

Dessa forma, o isolamento e a caracterização de novas cepas de *Pseudomonas* produtoras de biossurfactantes representam etapas essenciais para o avanço da biotecnologia microbiana. Além de possibilitar a descoberta de moléculas com propriedades inéditas, esses estudos contribuem para o desenvolvimento de soluções mais eficientes e ambientalmente adequadas em setores como biorremediação, agricultura, indústria farmacêutica e cosméticos. Assim, investir em bioprospecção

microbiana é uma estratégia chave para expandir o portfólio biotecnológico e impulsionar alternativas sustentáveis de produção (Miao *et al.*, 2024).

1.6 Mercado dos biossurfactantes

Devido a crescente conscientização da população sobre a preocupação ecológica, a procura por materiais de fontes renováveis tem sido crescente. Dessa forma o mercado global dos biossurfactantes tem sido impulsionado (Ambaye *et al.*, 2021). Em 2023, o valor de mercado dos biossurfactantes foi estimado em aproximadamente US\$ 4,41 bilhões, com projeções indicando que poderá atingir até US\$ 6,71 bilhões até 2032 (Grand View Research, 2024). Esse crescimento está atrelado à substituição de surfactantes sintéticos por alternativas sustentáveis como os biossurfactantes em setores de limpeza doméstica, cuidados pessoais, processamento de alimentos e agricultura (Singh *et al.*, 2019; Grand View Research, 2024).

A Europa representou cerca de 48,5% da participação total em pesquisas sobre biossurfactantes em 2023, liderando o mercado global, principalmente devido à forte ênfase em biotecnologia industrial e políticas ambientais rigorosas (Fortune Business Insights, 2024). No Brasil, esse mercado apresenta potencial significativo devido a abundância de matérias-primas renováveis e pelo interesse crescente em soluções ecológicas (Brumano *et al.*, 2016).

Além de iniciativas empresariais, instituições acadêmicas brasileiras têm contribuído significativamente para o avanço do mercado de biossurfactantes. Foi inaugurada em 2009 uma unidade-piloto para a produção de biossurfactantes da Instituto de Química da UFRJ com financiamento da Petrobras. Sendo uma instalação pioneira no Brasil, ela possui a capacidade de produzir 200 litros por semana, e visa desenvolver detergentes biodegradáveis a partir de glicerina, subproduto abundante da produção de biodiesel, para aplicações na limpeza de áreas contaminadas por derramamentos de óleo, tanto no solo quanto no mar (Correio Braziliense, 2009; Conexão UFRJ, 2009).

Atualmente, matérias-primas derivadas de combustíveis fósseis são mais baratas do que recursos renováveis. No entanto, com a utilização maciça das fontes não renováveis, essa tendência provavelmente se reverterá no futuro, tendo a necessidade da procura por materiais de fonte renovável. Com isso, aumentando ainda mais as perspectivas de longo prazo de surfactantes de base biológica (Nagtode *et al.*, 2023). A versatilidade de produtos químicos disponíveis para converter ácidos graxos e outras matérias-primas de base biológica em surfactantes viáveis e úteis apresenta as estimativas de crescimento para os

próximos anos. Esse crescimento está atrelado com o uso crescente de manufatura verde (Mohanty *et al.*, 2021).

Diante desse cenário, pode-se afirmar que os biossurfactantes representam alternativas sustentáveis frente aos desafios ambientais e econômicos atuais. A crescente demanda por processos e produtos ecologicamente corretos, aliada aos avanços da biotecnologia, tende a impulsionar o desenvolvimento de novos biossurfactantes (Poomalai *et al.*, 2024). Esse movimento também favorece a sua aplicação desses compostos em larga escala nos mais diversos setores industriais (Drakontis e Amin, 2020). Dessa forma, espera-se que a inovação tecnológica e maior conscientização ambiental acelerem a transição para modelos produtivos mais sustentáveis. Nesses modelos, os quais os biossurfactantes podem desempenhar um papel fundamental na substituição dos surfactantes sintéticos e na promoção de uma economia mais verde e circular (Dong *et al.*, 2024).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar da ampla utilização dos surfactantes químicos em diversos setores industriais, sua aplicação tem despertado preocupações quanto à segurança toxicológica e aos impactos ambientais. Estudos indicam que certos tipos de surfactantes estão associados ao surgimento de doenças como dermatites em humanos. Essas moléculas também podem apresentar elevada toxicidade para organismos aquáticos, representando uma ameaça à biodiversidade marinha. Além disso, esses compostos são, em sua maioria, derivados de fontes não renováveis, como o petróleo. Esse fator agrava sua pegada ambiental e levanta dúvidas sobre a viabilidade de seu uso a longo prazo.

Nesse contexto, os surfactantes de origem biológica têm despertado interesse crescente. Isso se deve às suas propriedades eficazes na redução de tensão superficial, além de serem biodegradáveis, biocompatíveis e apresentarem menor toxicidade quando comparados às suas contrapartes químicas. Esses atributos os tornam alternativas promissoras aos surfactantes sintéticos, especialmente em um cenário global que busca soluções mais sustentáveis.

Do ponto de vista biotecnológico, vários estudos vêm sendo realizados com foco na busca por novas cepas bacterianas com potencial biotecnológico. Além disso, a otimização das condições de cultivo também vem sendo estudada. Fatores como pH, temperatura e fontes de carbono e nitrogênio têm sido amplamente investigados para aumentar a produção e a eficiência dos biossurfactantes.

A espécie *P. aeruginosa* é amplamente reconhecida como a mais eficiente produtora de biossurfactantes do tipo ramnolipídeo. Essa eficiência está relacionada à sua elevada capacidade de síntese e ao alto rendimento obtido em condições laboratoriais controladas. No entanto, outras espécies do gênero *Pseudomonas* também têm demonstrado potencial promissor na produção desses. A prospecção de novas bactérias desse gênero amplia as possibilidades de aplicação industrial dos ramnolipídeos.

Apesar de seu elevado desempenho produtivo, o uso industrial de *P. aeruginosa* pode ser desencorajado. Isso se deve ao seu caráter de patógeno oportunista, que representa um risco à saúde humana. Além de ser uma característica indesejável para produtos biotecnológicos. Como consequência, pesquisas têm sido direcionadas à busca por alternativas mais seguras. Espécies ambientais e não patogênicas, como *P. putida*, *P. fluorescens* e *P. chlororaphis* e entre outras, vêm sendo investigadas como candidatas

viáveis para a produção de ramnolipídeos de forma segura e eficiente em escala industrial. Assim, torna-se importante explorar novas espécies de *Pseudomonas* spp. não patogênicas com potencial produtor de biossurfactante, especialmente em ambientes brasileiros ainda pouco investigados.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O objetivo geral deste projeto é realizar o isolamento e bioprospecção de cepas ambientais de *Pseudomonas* spp. para a produção de biossurfactantes, avaliando a produção do tensoativo produzido pelas estirpes isoladas, caracterizando sua atividade.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar cepas de *Pseudomonas* spp. a partir de amostras ambientais (água e sedimento) coletadas de dois pontos do estado do Rio de Janeiro;
- Identificar morfolologicamente e molecularmente as cepas isoladas;
- Realizar a bioprospecção de estirpes de *Pseudomonas* isoladas em relação a produção de moléculas com propriedade biosurfactante/bioemulsificante após cultivo submerso em três meios de cultura distintos;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Com o objetivo de facilitar a compreensão das etapas experimentais empregadas neste estudo, foi elaborado um fluxograma que sintetiza o delineamento metodológico adotado para o isolamento, triagem, identificação e caracterização dos isolados bacterianos de interesse. Essa representação esquemática permite uma visualização da sequência de procedimentos realizados, desde a obtenção das amostras ambientais até as análises fenotípicas e moleculares aplicadas aos isolados selecionados.

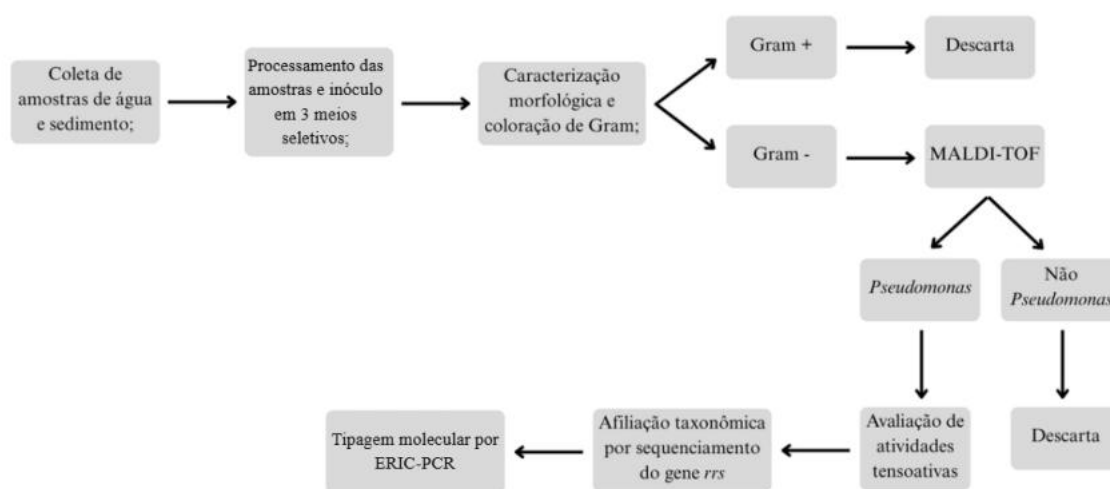


Figura 4. Fluxograma simplificado do desenho experimental do projeto.

4.1 Isolamento e obtenção das cepas

Com a intenção de isolar cepas bacterianas de origem ambiental, foram selecionadas áreas de coleta com menor influência de impactos antropogênicos. Para isso, escolheram-se dois pontos no estado do Rio de Janeiro: a Praia da Reserva de Grumari ($\approx 23^{\circ}02'59''$ S; $43^{\circ}31'50''$ W) e a Cachoeira das Almas, situada no Parque Nacional da Tijuca ($\approx 22^{\circ}56'56''$ S; $43^{\circ}17'10''$ W) onde foram coletadas amostras de água e sedimento de ambos os locais.

Foram coletados aproximadamente 250 mL de água e 100 gramas de sedimento com o auxílio de frascos de vidro e tubos tipo Falcon estéreis, respectivamente, em ambos os ambientes escolhidos. Em seguida, o material foi transportado para ser processado no laboratório conservado em caixas de isopor contendo gelo.

Visando gerar um enriquecimento das cepas do gênero alvo, foram inoculados 10 ml de amostra de água em frascos Erlenmeyer contendo 200 ml do meio de Cetrimide

ou Meio *Buffered Marine Yeast* (Anexo I), mantidas em agitação a 170 rpm por 24 horas a 28 °C. Por sua vez, as amostras de sedimento foram diluídas em solução salina (0,8%), em uma proporção 1:10 (m/v).

Para o isolamento das cepas bacterianas, as amostras de água enriquecidas e as amostras de sedimento diluídas foram inoculadas (20 µL de cada diluição), através do método de espalhamento, em cinco meios de cultura, visando favorecer o crescimento de microrganismos do gênero *Pseudomonas*. Para tal, foram utilizados os meios de cultivo: Ágar MacConkey (KASVI), Ágar Cetrimide (KASVI), Ágar de Carbono, Cálcio e Citrato (ACC), Ágar Acetamida Cetrimide Glicerol Manitol e Ágar *Buffered Marine Yeast* (Atlas, 2010) (Anexo I).

As placas foram incubadas a 30 °C por um período de 24 – 120 h. Foram selecionadas para isolamento todas as colônias bacterianas que apresentaram crescimento. Nos casos em que houve grande similaridade entre os morfotipos das colônias em um mesmo meio de cultura e mesma diluição, foram escolhidas três colônias do mesmo morfotipo. Os isolados bacterianos obtidos foram criopreservados em meio LB (Luria Bertani) (Anexo I) contendo 20% de glicerol, em freezer (-18 °C) e em ultrafreezer (-80 °C).

A nomenclatura das cepas isoladas foi padronizada de acordo com características da amostra e do processo de isolamento. A primeira letra indica o tipo de amostra, sendo A para água e S para sedimento. A segunda letra corresponde ao local de coleta: D para água doce (Cachoeira das Almas) e S para água salgada (Praia de Grumari). Para as amostras de água, uma terceira letra indica a etapa de enriquecimento, sendo C para Cetrimide e M para Meio *Buffered Marine Yeast*. A última letra identifica o meio de cultura em que o isolado foi obtido: A para ágar MacConkey, B para ágar Cetrimida, C para ágar ACC, D para ágar Cetrimida-Cetamida-Manitol e E para ágar *Buffered Marine Yeast*. Por fim, a numeração indica a ordem de descrição dos isolados. Como exemplo: A cepa ADCC12 foi isolada de água doce (Cachoeira das Almas), enriquecido em meio Cetrimida e isolado no meio ACC. Por sua vez a cepa SS1XA4 – isolado de sedimento de água salgada (Praia de Grumari) e isolado no meio MacConkey.

4.2 Caracterização morfológica de colônias

Durante o isolamento, as colônias bacterianas selecionadas foram submetidas à caracterização morfológica macroscópica, levando em consideração os seguintes parâmetros:

- Cor: As colônias foram classificadas de acordo com a coloração ou pigmentação apresentada;
- Forma da colônia: A análise considerou o contorno geral da colônia, que puderam ser classificados como circular, irregular, rizoide, entre outras.
- Formato da borda: As margens das colônias foram avaliadas quanto à regularidade e padronização, sendo descritas como: lisa (regular), ondulada, lobada (com protrusões arredondadas) ou denteada (com projeções pontiagudas).
- Elevação: Este parâmetro se referiu ao perfil vertical da colônia em relação à superfície do meio de cultivo, sendo categorizado como: convexa alta, convexa baixa, centro satélite, centro deprimido ou papiliforme (aspecto de pequenas elevações no centro).
- Superfície: A textura superficial foi analisada, sendo classificada como lisa, rugosa, pregueada (com dobras visíveis) ou círculos concêntricos.
- Consistência: Foi avaliada por meio do toque com alça bacteriológica, e as colônias serão descritas como cremosas (macias e homogêneas), viscosas (pegajosas), granulosas (com grânulos perceptíveis) ou secas (quebradiças ou pulverulentas).
- Transparência: As colônias foram avaliadas em relação à passagem de luz, sendo categorizadas como opaca (não translúcida), translúcida (permite a passagem parcial da luz) ou transparente (permite a passagem total da luz).

4.3 Coloração de Gram

A coloração de Gram foi realizada com o objetivo de caracterizar a morfotintorialmente as bactérias isoladas. As lâminas foram preparadas a partir de culturas bacterianas frescas que foram espalhadas em fina camada juntamente com uma gota de água destilada e fixadas pelo calor. Em seguida, as lâminas foram submetidas à aplicação sequencial dos reagentes: cristal violeta (corante primário) por 1 minuto, solução de Lugol (mordente) por 1 minuto, álcool-etanol 95% (agente de descoloração)

por 20 a 30 segundos, e, por fim, fucsina básica (contracorante) por 30 segundos. Entre cada etapa, as lâminas foram cuidadosamente lavadas com água destilada. Após a coloração, as lâminas foram secas e observadas ao microscópio óptico, utilizando objetiva de imersão (100×) (Vermelho, 2006)

As bactérias que apresentaram coloração rosa-avermelhada e morfologia de bacilos foram classificadas como gram-negativas. Essas cepas foram selecionadas para a continuidade dos testes, considerando que os microrganismos do gênero *Pseudomonas* são bacilos gram-negativos. Por outro lado, as amostras que mantiveram a coloração roxa foram classificadas como gram-positivas e descartadas, assim como aquelas que exibiram morfologia de cocos ou leveduriforme (Beveridge, 2001).

4.4 Identificação das bactérias por espectrometria de massa MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/ionization - Time of flight*).

Para realizar a identificação dos isolados obtidos foram realizados a espectrometria de massas MALDI-TOF. As cepas foram inoculadas em meio LB e incubadas a 30°C por 48h. As colônias crescidas foram depositadas, em duplicatas, na placa metálica utilizada no espectrômetro de massa MALDI-TOF Microflex LT (Bruker Daltonics). Após a deposição completa do material bacteriano, foi adicionado a cada amostra 1 µL de ácido trifluoroacético a 2,5%. Após a secagem do ácido foi adicionada 1 µL da matriz composta por ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico preparado em acetonitrila 50%. Transcorrido o tempo necessário para a secagem da mistura e, conseqüentemente, a formação dos cristais, a placa de metal foi inserida no aparelho para a leitura das amostras.

Os espectros de massa das amostras foram adquiridos no modo linear, utilizando os seguintes parâmetros operacionais: frequência do laser de 20 Hz, voltagem das fontes iônicas 1 e 2 de 20 kV e 18,6kV, respectivamente, e faixa de detecção de massa molecular entre 2.000 e 20.000 Daltons. A aquisição dos espectros foi realizada a partir do somatório de 240 disparos do laser, distribuídos e quatro grupos de 60 disparos, aplicados em regiões distintas e selecionadas aleatoriamente no poço onde se encontrará a amostra na placa metálica.

Os espectros das amostras foram processados por meio de software Biotyper, versão 3.1 (Bruker Daltonics), o qual realiza a comparação dos espectros obtidos com uma biblioteca própria de espectros de referência. O software gera uma lista contendo os dez microrganismos com maior grau de similaridade em relação à amostra analisada,

classificando-os por meio de um sistema de pontuação (*score*) que varia de 0,0 a 3,0. De acordo com os critérios estabelecidos pelo fabricante, os *scores* são interpretados conforme o quadro 4.

Quadro 4. Interpretação de *score* do MALDI-TOF

<i>Score</i>	Interpretação	Cor
≥ 2,30	Identificação altamente confiável em nível de espécie	Verde
2,00 – 2,29	Identificação confiável em nível de gênero e provável em nível de espécie	Amarelo
1,70 – 1,99	Identificação provável em nível de gênero	Amarelo
< 1,70	Identificação não confiável	Vermelho

Tabela 1. Interpretação de *score* do MALDI-TOF

As bactérias foram selecionadas utilizando-se como critério de seleção aquelas amostras com *score* igual ou superior a 1,70, indicando identificação provável e confiável a nível de gênero, correspondente ao gênero *Pseudomonas*. Apenas as amostras que atenderam a esse critério foram selecionadas para as etapas subsequentes do estudo.

4.5 Produção do biossurfactante

4.5.1 Meios de cultivo

Para a avaliação preliminar da produção de biossurfactantes, foram utilizados três meios de cultura distintos que favorecem a produção de biossurfactante do tipo ramnolípido por *Pseudomonas*, com o objetivo de selecionar as cepas que apresentarem maior capacidade de produção de biossurfactantes e/ou emulsificantes. Logo, foram selecionados meios de cultura já descritos anteriormente na literatura para produção de ramnolípídios por *Pseudomonas*: Meio mínimo de sais 1 (MSM1) (Santos *et al.*, 2002), Meio mínimo de sais 2 (MSM2) (Phulpoto *et al.*, 2021a) e Meio mínimo de sais 3 (MSM3) (Pereira *et al.*, 2013).

Meio Mínimo de Sais 1, composição por litro:

NaNO ₃	5.54g·L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.2g·L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	7g·L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	3g·L ⁻¹
Glicerol.....	30 g·L ⁻¹

Meio Mínimo de Sais 2, composição por litro:

NaHPO ₄	2.2g·L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1.4g·L
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0.6g·L ⁻¹

FeSO ₄ 7H ₂ O.....	0.01 g·L ⁻¹
NaCl.....	0.3 g·L ⁻¹
CaCl ₂	0.02 g·L ⁻¹
Glicerol.....	20 g·L ⁻¹
(NH ₂) ₂ CO.....	1 g·L ⁻¹
Solução de oligoelementos.....	1 g·L ⁻¹
Solução de oligoelementos composição por litro:	
ZnSO ₄ 7H ₂ O.....	2.32 g·L ⁻¹
MnSO ₄ 4H ₂ O.....	1.78 g·L ⁻¹
H ₃ BO ₃	0.56 g·L ⁻¹
CuSO ₄ 5H ₂ O.....	1.0 g·L ⁻¹
NH ₄ MoO ₄ 2H ₂ O.....	0.39 g·L ⁻¹
KI.....	0.66 g·L ⁻¹

Meio Mínimo de Sais 3, composição por litro:

Glicerol	50 g·L ⁻¹
NaNO ₃	4 g·L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	7 g·L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	3 g·L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0.2 g·L ⁻¹

4.5.2 Processo de obtenção do biossurfactante

Com o objetivo de avaliar a produção de biossurfactantes pelas diferentes cepas de *Pseudomonas* isoladas, foram utilizados três protocolos específicos de produção. Inicialmente, as cepas foram reativadas em meio ágar LB e incubadas a 30 °C por 48h para todos os três protocolos de cultivo. Em seguida, o cultivo e a obtenção dos sobrenadantes foram conduzidos das seguintes da seguinte forma:

1. Para o cultivo em MSM1, as cepas isoladas foram inoculadas com o auxílio de uma alça bacteriológica. Em seguida as cepas foram cultivadas em agitação orbital a 170 rpm por 7 dias a uma temperatura de 30 °C, como descrito por Santos e colaboradores (2002).
2. Para o meio MSM2, as cepas de *Pseudomonas*, previamente reativadas, foram transferidas para um pré-inóculo contendo 100 mL de meio LB, utilizando-se alça bacteriológica. As culturas foram incubadas sob agitação orbital a 150 rpm por 18 h. Em seguida, uma alíquota de 2% (v/v) do pré-inóculo foi transferida para o meio MSM2. O cultivo foi mantido sob agitação orbital a 170 rpm por sete dias a 28 °C, conforme descrito por Phulpoto e colaboradores (2021).

3. Para o cultivo em MSM3, o pré-inóculo foi preparado com a seguinte composição: 4 g/L de NaNO₃, 0,2 g/L de MgSO₄·7H₂O, 7 g/L de K₂HPO₄, 3 g/L de KH₂PO₄, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de peptona. A inoculação foi realizada com o auxílio de uma alça bacteriológica, seguida de incubação a 30 °C por 24 h sob agitação orbital a 170 rpm. Após esse período, uma alíquota de 2% (v/v) do pré-inóculo foi transferida para o meio MSM3, o qual foi submetido ao cultivo submersa por sete dias, também a 30 °C e 170 rpm.

Todos os cultivos citados foram realizados em triplicata biológica. Após o cultivo submerso, as amostras foram submetidas a centrifugação a 12.500 *xg* durante 10 min a 4°C, para a obtenção do sobrenadante contendo biossurfactante. Em seguida os sobrenadantes foram autoclavados a 121 °C por 15 min e armazenados em -20 °C para etapas subsequentes de análise.

4.6 Avaliação das atividades tensoativas para triagem

4.6.1 Avaliação da capacidade emulsificante

O índice de emulsificação (IE) foi feito para avaliar a capacidade do biossurfactante em realizar emulsões estáveis (Cooper e Goldenberg, 1987). Para isso, foi utilizado 1,5 mL do sobrenadante livre de células e 1,5 mL de uma fase líquida imiscível (óleo de soja ou *n*-hexadecano) em tubos de ensaio. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em agitador do tipo vórtex por dois minutos. Na sequência, os tubos foram mantidos em repouso por 24h. Posteriormente, foi realizada a medição da altura total de líquido e da camada emulsificada com o auxílio de um paquímetro. A partir disso, o IE foi calculado através da razão da altura da camada emulsificada e da altura total do líquido (Equação 1). O meio de cultura utilizado no cultivo foi empregado como controle negativo, enquanto uma solução do surfactante químico dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% foi utilizada como controle positivo. Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

Equação 1:

$$IE (\%) = \frac{\text{altura da camada emulsificada}}{\text{altura total de líquido}} \times 100$$

4.6.2 Avaliação da tensão superficial

A tensão superficial das amostras foi feita através do método de gota pendente (Song e Springer, 1996). Nesse método, foi utilizado um goniômetro Krüss DSA30 equipado com um sistema de processamento de imagem conectado a um computador. O software realiza a medição de cada gota suspensa na ponta de uma agulha. A análise considera o volume e a curvatura da gota, possibilitando o cálculo da tensão superficial da amostra. Os valores finais foram obtidos a partir da média de medições realizadas com 10 gotas suspensas. Como controle da redução foi utilizado a água, que tem uma tensão superficial de aproximadamente 72 mN/m. Como controle negativo do experimento foi utilizado o meio de cultura utilizado no cultivo submerso.

4.7 Identificação pelo sequenciamento do gene *rrs*, codificador da subunidade 16S

A identificação molecular das estirpes foi realizada por meio do sequenciamento do gene *rrs*, que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal. Para amplificação deste gene, foram empregados os iniciadores universais específicos para o domínio *Bacteria*: 27F (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG - 3') e 1492R (5'-GTT TAC CTT GTT ACG ACT T - 3') (Lane, 1991). As reações de PCR foram conduzidas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 50 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos e 30 segundos, com uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram purificados com o kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, EUA), conforme as instruções do fabricante.

O sequenciamento parcial do gene *rrs* foi realizado em três reações independentes para cada estirpe, utilizando os iniciadores 515F, 785F e 907R (Lane, 1991). As amostras foram enviadas à Plataforma de Sequenciamento de DNA do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, vinculada ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). O sequenciamento foi realizado em um sistema automatizado SeqStudio™ (Applied Biosystems – Thermo Fisher Scientific™).

Os arquivos brutos obtidos (eletroferogramas) foram analisados por meio do software Unipro UGENE v.39, o qual realizou a leitura automatizada das sequências (*base calling*). Sequências curtas ou de baixa qualidade foram descartadas, e as de boa qualidade, obtidas a partir de cada estirpe, foram unidas para compor uma sequência consenso (*contig*), que será utilizada para a classificação taxonômica.

A comparação com sequências de organismos previamente caracterizados foi feita por meio do banco de dados rRNA do NCBI, utilizando a ferramenta BLASTn (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Em cada análise, foi selecionadas aproximadamente duas a três sequências de linhagens com maior similaridade com cada estirpe analisada. A árvore filogenética será construída utilizando a ferramenta UGENE, a partir das sequências similares obtidas nas análises do BLASTn.

4.8 Tipagem molecular por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* – PCR (ERIC-PCR)

Para a tipagem molecular das cepas de *Pseudomonas* isoladas, foi realizada a técnica de ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* – PCR). Esse método teve como objetivo diferenciar as cepas que apresentaram a mesma afiliação taxonômica, determinada por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA.

Para a execução da técnica, primeiramente foi realizado o cultivo das cepas de *Pseudomonas* em meio LB líquido incubado overnight a 170 rpm e 30 °C. A extração do DNA genômico foi feita utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, EUA). Inicialmente, 1 mL da cultura bacteriana foi submetido à centrifugação a 14.000 xg por dois minutos, a fim de obter o pellet celular. O sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi diretamente submetido à etapa de lise celular.

A lise celular foi conduzida pela adição de 600 µL da solução de lise nuclear (*Nuclei Lysis Solution*), seguida de homogeneização suave por pipetagem. As amostras foram incubadas a 80 °C por 5 minutos e, posteriormente, resfriadas à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 3 µL da solução de RNase, com incubação a 37 °C por 15 a 60 minutos, seguida de novo resfriamento à temperatura ambiente. A etapa de precipitação de proteínas foi realizada com a adição de 200 µL da solução de precipitação proteica (*Protein Precipitation Solution*), seguida de agitação em vortex e incubação em gelo por 5 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 14.000 xg por 3 minutos, e o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo microtubo estéril.

Para a precipitação do DNA, adicionaram-se 600 µL de isopropanol em temperatura ambiente, com mistura suave por inversão. As amostras foram centrifugadas novamente nas mesmas condições utilizadas anteriormente, e o sobrenadante foi descartado. O pellet de DNA obtido foi lavado com 600 µL de etanol 70% em temperatura ambiente, seguido

de centrifugação por 2 minutos a 14.000 xg. Após a remoção do etanol, o pellet foi seco ao ar por 10 minutos. Finalmente, o DNA foi ressuspendido em 100 µL da solução de reidratação (*Rehydration Solution*) e incubado por 1 hora a 65 °C, garantindo a completa solubilização. O DNA obtido foi então utilizado como molde para as reações de amplificação por ERIC-PCR.

Para a reação de ERIC-PCR foi realizado por meio de dois iniciadores ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') e ERIC2F (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC G-3'), conforme descrito por De Bruijn (1992). Cada reação foi preparada em um volume final de 25 µL, contendo: 1 µL de DNA genômico, 0,4 µM de cada iniciador, 8,6 µL de Master Mix e água Milli-Q para completar o volume.

As condições de amplificação consistiram em uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 50 segundos, anelamento a 46°C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, com uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, preparado em tampão TEB 1X, conforme descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). A corrida eletroforética foi conduzida a 80 V por 2 horas. Para a visualização das bandas, foi adicionado 1 µL de SYBR® Safe (Invitrogen®) para cada 20 mL de gel, e as imagens foram obtidas em transiluminador UV.

5. RESULTADOS

5.1 Isolamento das bactérias

Ao todo, foram isoladas 95 bactérias a partir das amostras coletadas, sendo 63 de água e 32 de sedimento (Figura 4a). A Cachoeira das Almas apresentou o maior número de isolados (56), sendo 26 provenientes das amostras de água e 30 das amostras de sedimento (Figura 4b). Por sua vez, na Praia de Grumari foram obtidos 39 isolados, dos quais 33 eram provenientes da água e apenas 6 do sedimento (Figura 4c). Essa diferença evidencia variações na disponibilidade microbiana entre os diferentes ambientes.

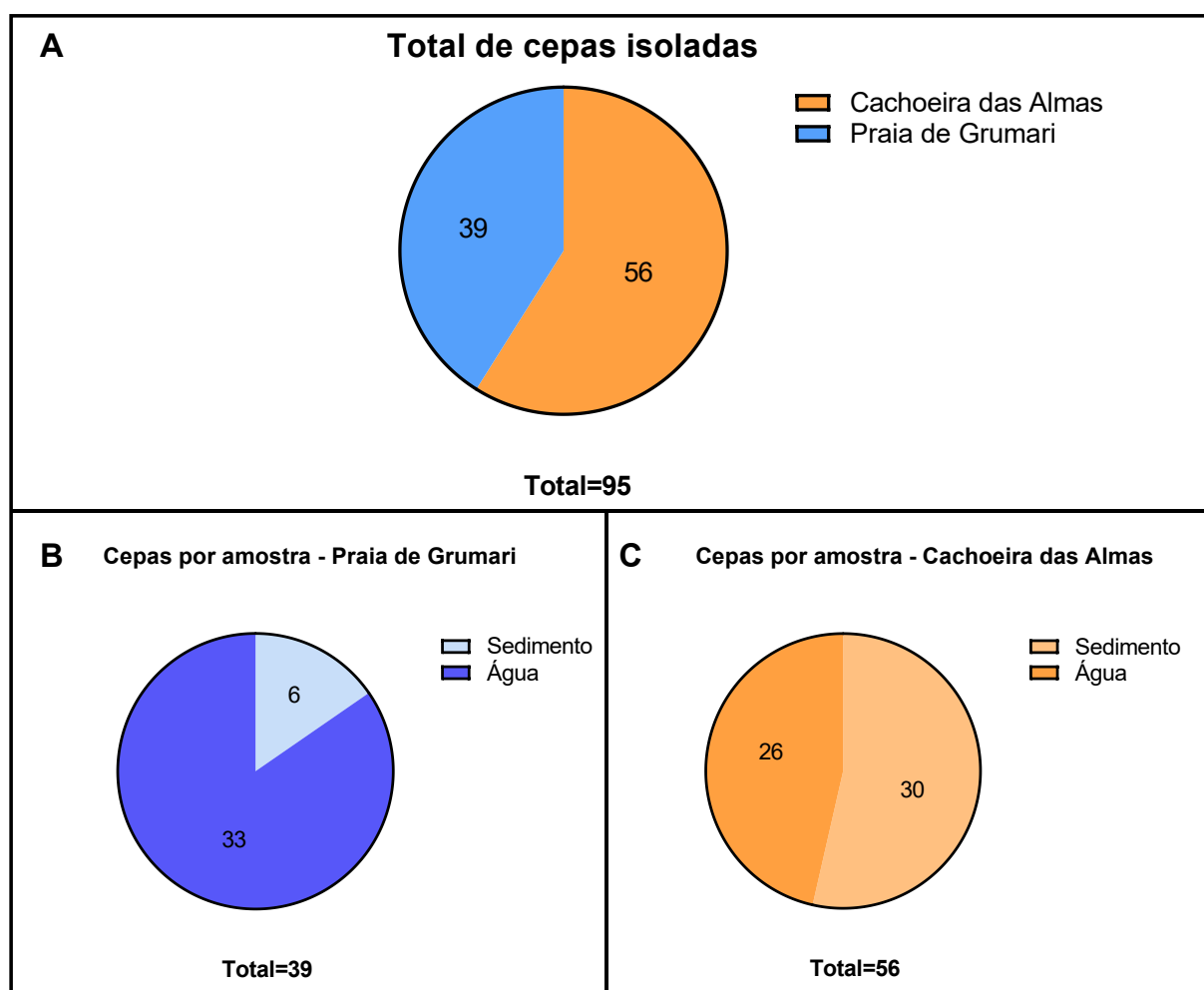


Figura 4: Frequência relativa de isolados de acordo com o local de isolamento e tipo de amostra (água ou sedimento). **A.** Isolados totais dos locais de coleta. **B.** Isolados da Praia de Grumari de acordo com tipo de amostra. **C.** Isolados Cachoeira das Almas de acordo com o tipo de amostra.

O número de isolados obtidos variou de acordo com os meios de cultura utilizados. A partir do total de isolados foram obtidas 21 cepas no Ágar MacConkey, 31 no Ágar Cetrimide, 15 no Ágar de ACC, 8 no Ágar Acetamida Cetrimide Glicerol Manitol e 12 no Ágar (Figura 5).

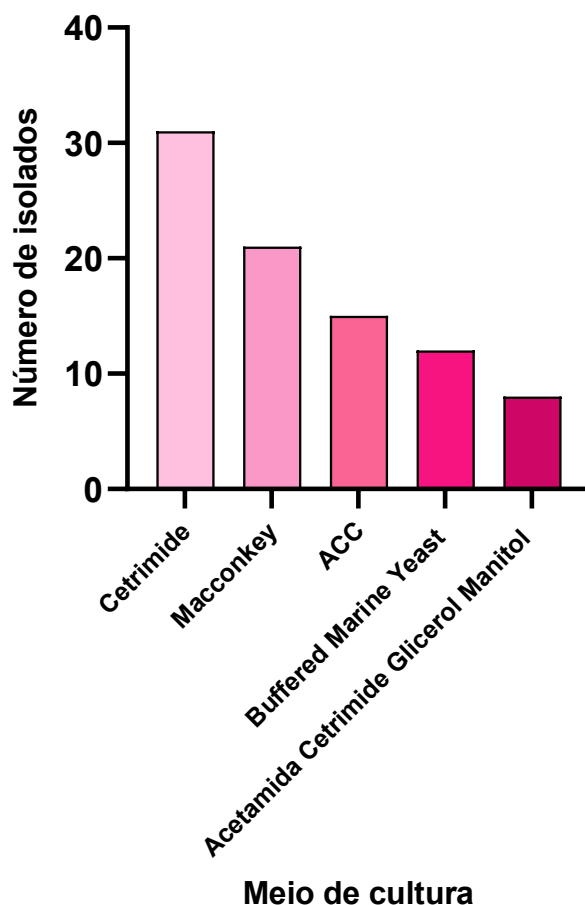


Figura 5: Distribuição dos isolados totais de acordo com o meio de cultura de isolamento.

5.2 Identificação das bactérias isoladas

Para a identificação das bactérias isoladas foram empregados dois métodos: coloração de Gram e espectrometria de massas (MALDI-TOF). A coloração de Gram foi utilizada como etapa inicial para a seleção de bacilos gram-negativos, com o objetivo de direcionar a análise para possíveis cepas de *Pseudomonas*, uma vez que este gênero é caracterizado por apresentar tal perfil. Entre as 95 bactérias testadas, 85 foram classificadas como bacilos gram-negativos (Tabela 2).

Considerando que a maioria dos isolados foi classificada como gram negativas, todas as bactérias foram submetidas à identificação por MALDI-TOF (Tabela 2). Dentre os resultados obtidos, 25 amostras apresentaram *score* entre 2,51 e 2,01, indicando identificação segura em nível de gênero e provável em nível de espécie; enquanto 18 amostras apresentaram *score* entre 1,99 e 1,70, correspondente a identificação provável em nível de gênero; por fim, 7 isolados não puderam ser identificados.

No total, 57 isolados foram classificados como pertencentes ao gênero *Enterobacter*. Também foram identificados representantes dos gêneros *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Serratia*, *Chryseobacterium*, *Escherichia*, *Kluyvera*, *Acinetobacter* e *Pantoea* (Tabela 2).

Por fim, 13 isolados foram identificados como possíveis pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sendo eles ADCB 34, ADCB35, ADCB37, ADCB38, ADCB39, SDA3, SDA5, SDA8, SDA11, SDA13, SDC1.4, SDB1.4 E ADCC1.9. Dentre estes, 10 foram identificados como *Pseudomonas putida* (score entre 2,03 e 1,83), além de isolados classificados como *Pseudomonas asplenii* (score entre 1,93 e 2,03), *Pseudomonas chlororaphis* (score 1,90), *Pseudomonas koreensis* (score 1,70) e *Pseudomonas corrugata* (score 1,96) (Tabela 2).

Tabela 2. Panorama geral de isolados envolvendo distribuição por local de isolamento e tipo de amostra, coloração de Gram e espectometria de massas MALDI-TOF.

Código das cepas	Local de isolamento	Tipo de amostra	Coloração de Gram	Espectometria de massas (MALDI-TOF)	Score
SDA 1	Cachoeira das Almas	Sedimento	Positivo	-	
SDC 5	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	1.75
ADCB 37	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Pseudomonas putida</i>	1.83
ADCB 38	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Pseudomonas putida</i>	1.81
ADCB 39	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Pseudomonas putida</i>	1.83
ASMB 9	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.39
ASMB 8	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.44
ASMB 7	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.30
ASCB 10	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.39
ASCB 11	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.36
ASCB 12	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.37
ADCB 36	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.26
ASCB 13	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.38
ASCB 14	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.42
ADCB 34	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Pseudomonas putida</i>	1.92
ADCB 35	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Pseudomonas putida</i>	1.97
ASCB 15	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.38
ADCB 28	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.23
ADCB 29	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.39
ADCB 30	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.43
SDE3	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Escherichia coli</i>	1.72
ASMB 4	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.02
SDA 1	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.30
SDA 2	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.21
SDA 3	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Pseudomonas asplenii</i>	1.93
SSC	Praia de Grumari	Sedimento	Positivo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2.22
SDA 5	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1.90
SDA 6	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	2.35

SDA 13	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Pseudomonas asplenii</i>	2.08
SDA 8	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Pseudomonas putida</i>	2.03
ASMB 5	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.42
ASMB 6	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter kobei</i>	2.08
ADCA	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Enterobacter kobei</i>	2.37
SDC 2	Cachoeira das Almas	Sedimento	Positivo	<i>Bacillus cereus thuringiensis</i>	2.26
SDA 10	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Serratia fonticola</i>	1.98
SDA11	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Pseudomonas koreensis</i>	1.70
SDA12	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Enterobacter bugandensis</i>	2.01
SDC 1.8	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.29
SDC 1.7	Cachoeira das Almas	Sedimento	Positivo	-	
ASMB2	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.50
ASMB3	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.36
ADMB 19	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.32
ADMB 20	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.31
ADMB 21	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.22
SDA 4	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	2.25
ASME7	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.41
ASCE11	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.39
ASCE12	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.37
ASMA21	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.45
ADCE6	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Enterobacter kobei</i>	2.31
SDC1.4	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Pseudomonas corrugata</i>	1.96
SDA16	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Serratia marcescens</i>	2.24
SDE1	Cachoeira das Almas	Sedimento	Positivo	-	
SDE2	Cachoeira das Almas	Sedimento	Positivo	-	
ASME8	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.42
ADMB1.3	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.44
ASME9	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.45
ASME10	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.20
ADMD1.2	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.40
ADCC1.9	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Pseudomonas putida</i>	1.93
ASMD1.3	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter kobei</i>	2.38
ASCC1.10	Praia de Grumari	Água	Positivo	-	
SDC1.8	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.30
ASCD6	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.39
SSC4	Praia de Grumari	Sedimento	Positivo	<i>Staphylococcus warneri</i>	2.44
SD1.6	Cachoeira das Almas	Sedimento	Positivo	-	
SSC3	Praia de Grumari	Sedimento	Positivo	<i>Staphylococcus warneri</i>	2.34
SSC1	Praia de Grumari	Sedimento	Positivo	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1.93
SSC5	Praia de Grumari	Sedimento	Positivo	<i>Staphylococcus warneri</i>	2.20
SSC6	Praia de Grumari	Sedimento	Positivo	<i>Staphylococcus warneri</i>	2.46
ASCD5	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.51
SDB1.4	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Pseudomonas putida</i>	1.98
SDC1.11	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Enterobacter hormaechei</i>	1.99
ASCD1	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.42
ASCD2	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.32

ASCD3	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.35
ASCD4	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.20
ADCE5	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.44
ADMB18	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.36
ASMA23	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.37
ASCA19	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.27
SDA15	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Pantoea vagans</i>	2.16
SDA16	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Serratia marcescens</i>	2.24
SDA17	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Serratia fonticola</i>	1.88
ASMB	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.23
ADMB17	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.23
ASMA22	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.49
ADCA18	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.40
ADCA20	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.40
SDA100	Cachoeira das Almas	Sedimento	Positivo	-	
SDA101	Cachoeira das Almas	Sedimento	Negativo	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.25
ADCE4	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.28
ADMB16	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.32
ASCD4	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.33
ADCC1.10	Cachoeira das Almas	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.37
ASME9	Praia de Grumari	Água	Negativo	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.33

5.3 Sequenciamento e afiliação taxonômica

Após a confirmação da atividade tensoativa das cepas selecionadas, foram realizados o sequenciamento parcial do gene *rrs* e a análise de afiliação taxonômica. Essa etapa teve como objetivo corroborar as identificações previamente obtidas por MALDI-TOF. Dessa forma foi possível assegurar maior robustez à nível de gênero e possibilitar uma classificação mais acurada em nível de espécie.

Das 95 cepas bacterianas isoladas, apenas as 13 previamente identificadas por MALDI-TOF como *Pseudomonas* spp. foram submetidas ao sequenciamento do gene *rrs*, codificador da subunidade 16S rRNA. As sequências obtidas foram analisadas por meio da plataforma NCBI Blast, sendo selecionadas de 2 a 4 cepas com identidade $\geq 98\%$ de similaridade para a construção de uma árvore filogenética.

Os resultados confirmaram que todas as cepas pertencem ao gênero *Pseudomonas* (Figura 9). Dentre elas, 7 cepas apresentaram identidade como *Pseudomonas wayambapalatensis*, 2 com *Pseudomonas putida*, 2 com *Pseudomonas saponiphila* e 1 com *Pseudomonas chlororaphis* (figura 6, quadro 5).

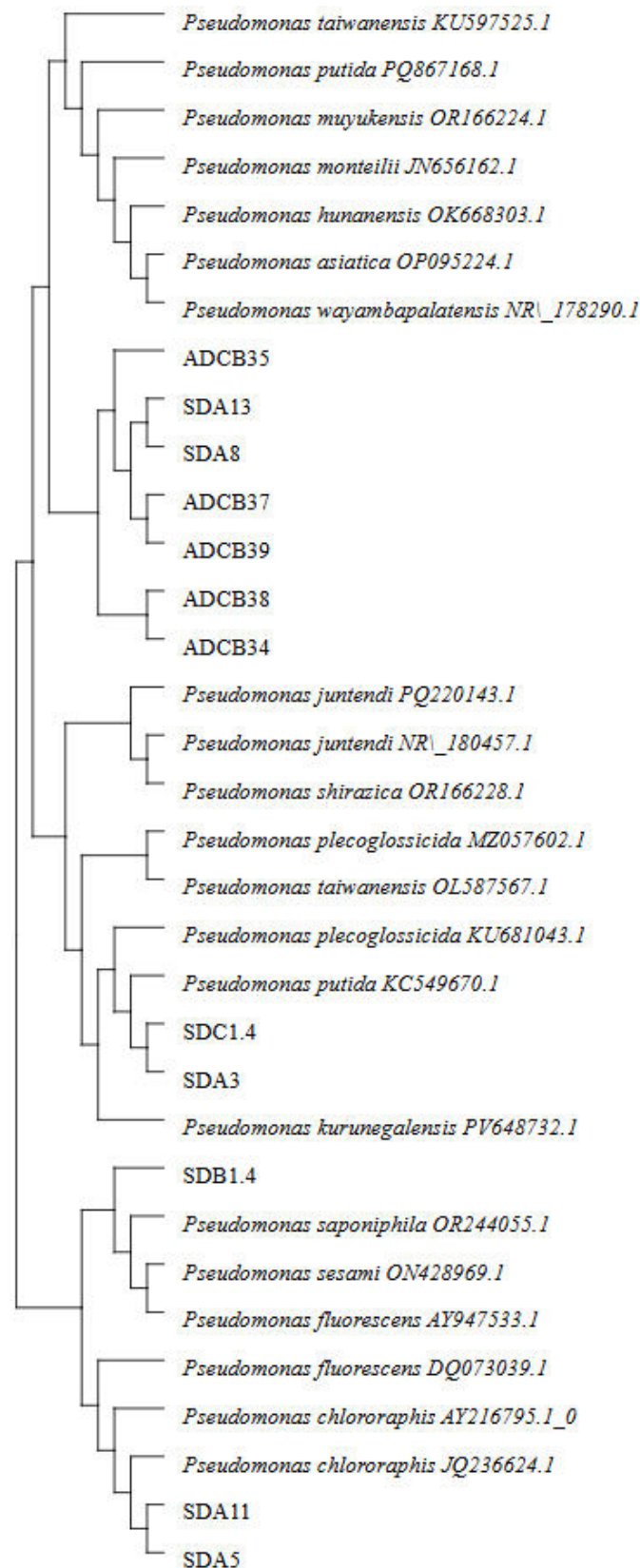


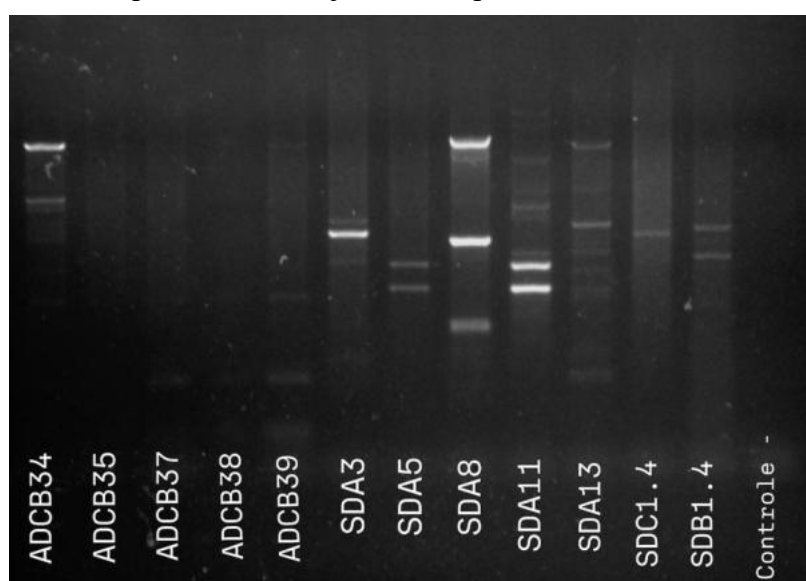
Figura 6: Árvore filogenética construída com base na análise das sequências do gene 16S rRNA de cepas do gênero *Pseudomonas*. Os agrupamentos indicam a proximidade filogenética das cepas isoladas em relação às espécies já descritas, evidenciando sua afiliação dentro de diferentes clados do gênero *Pseudomonas*.

Quadro 5. Afiliação taxonômica das amostras isoladas

Cepa isolada	Identificação mais próxima
SDA3; SDC1.4.	<i>Pseudomonas putida</i>
ADCB 35; SDA13; SDA 8; ADCB 37; ADCB 39; ADCB 38; ADCB 34.	<i>Pseudomonas wayambapalatensis</i>
SDB 1.4	<i>Pseudomonas saponiphila</i>
SDA11; SDA 5.	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>

5.4 Tipagem molecular (ERIC-PCR)

A tipagem molecular por ERIC-PCR permitiu avaliar o perfil genético dos isolados, evidenciando o grau de diversidade presente entre as cepas analisadas. A análise dos padrões de bandas obtidos indicou que as cepas ADCB37, ADCB38 e ADCB39 apresentam alta similaridade, sugerindo uma possível relação clonal (figura 10). Esse resultado é coerente com o fato de que essas amostras foram coletadas no mesmo local e obtidas a partir do mesmo meio de cultura, diferenciando-se apenas no grau de diluição. Por outro lado, os demais isolados apresentaram padrões de bandas distintos, indicando variabilidade genética entre eles. Esses achados apresentam uma visão geral consistente sobre a diversidade molecular presente no conjunto de cepas avaliadas

**Figura 7:** Visualização de amplicons de DNA em gel de agarose depois da eletroforese.

5.5 Avaliação das capacidades tensoativas

5.5.1 Índice de emulsificação

Os valores de IE foram obtidos em óleo de soja e em n-hexadecano a partir dos sobrenadantes contendo biossurfactantes obtidos a partir do cultivo dos isolados em 3 meios de cultura diferentes (MSM1, MSM2 e MSM3) (figura 6 e 7). O controle utilizado foi SDS. O MSM2 apresentou os maiores valores de índice de emulsificação (IE) para a maioria das amostras emulsificadas em óleo de soja, com porcentagens variando entre 45 e 50%, indicando boa capacidade emulsificante (figura 8). A única exceção foi a amostra ADCB34, que apresentou seu melhor desempenho no MSM1; entretanto, os valores obtidos nesse meio foram muito próximos aos observados no MSM2, não representando diferença significativa. Outro ponto relevante é que o MSM2 exibiu baixa variação entre as triplicatas biológicas, evidenciando maior consistência dos resultados obtidos.

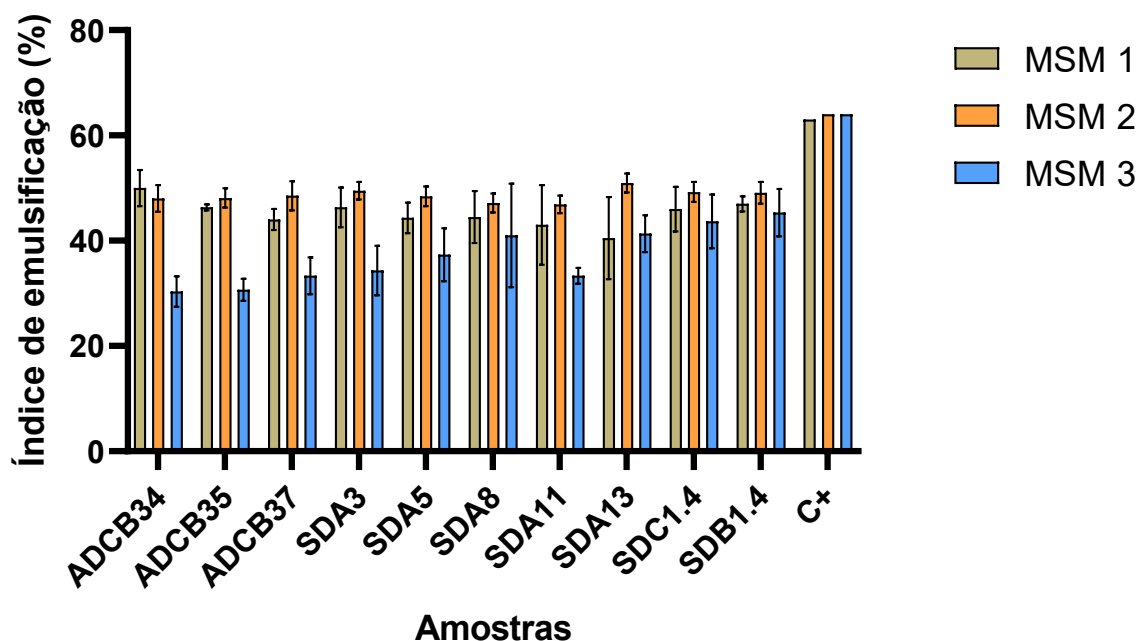


Figura 8: Valores dos IEs em óleo de soja do sobrenadante bruto contendo biossurfactantes produzidos em MSM1 (cor verde), MSM2 (cor laranja) e MSM3 (cor azul). Como controle positivo foi utilizado SDS 10%.

De maneira geral, tanto o MSM1 quanto o MSM2 demonstraram ser meios adequados para a produção de emulsificantes, uma vez que a maior parte das amostras apresentou índices de emulsificação entre 45 e 51%, faixa considerada indicativa de boa atividade emulsificante.

Os valores de índice de emulsificação obtidos com hexadecano (figura 9) apresentaram maior variabilidade entre as amostras e menor estabilidade quando comparados aos resultados obtidos com óleo de soja (figura 8 e 9). A amostra SDC1.4, por exemplo, não apresentou emulsificação no MSM2, enquanto no MSM3 exibiu valores dispersos, variando de 8% a 64% entre as triplicatas biológicas, evidenciando elevada heterogeneidade na resposta. Esse padrão de grande desvio padrão foi observado para a maioria das amostras testadas, especialmente no MSM3, sugerindo baixa reprodutibilidade nesse meio quando utilizado com hexadecano como fase hidrofóbica.

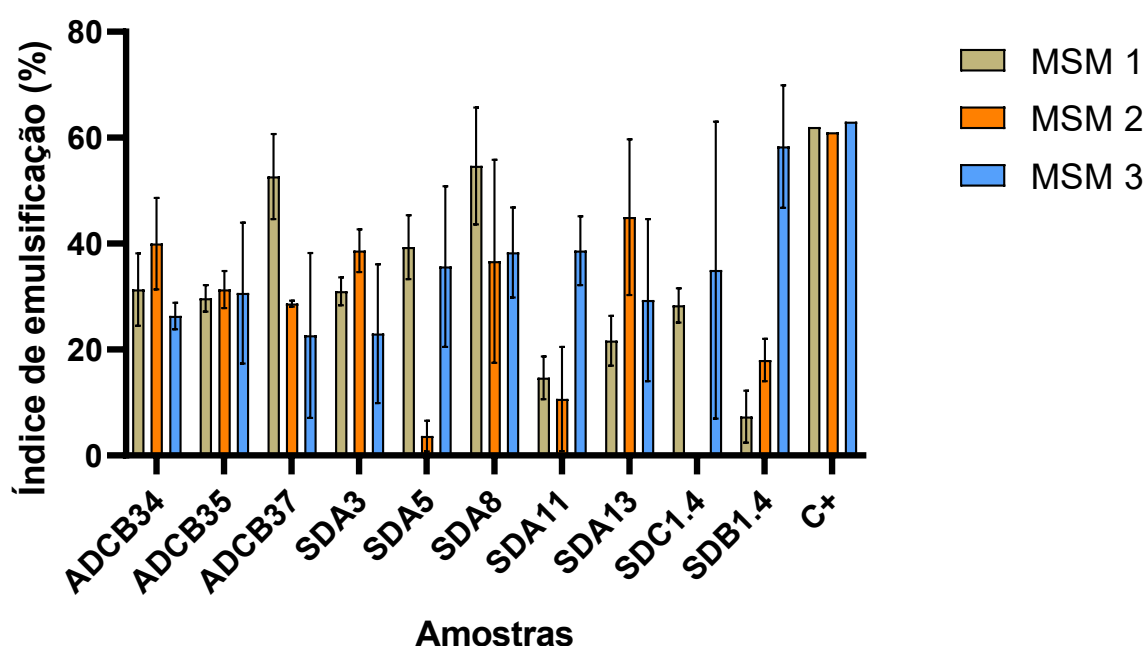


Figura 9: Valores dos IEs em n-hexadecano do sobrenadante bruto contendo biossurfactantes produzidos em MSM1 (cor verde), MSM2 (cor laranja) e MSM3 (cor azul). Como controle positivo foi utilizado SDS 10%.

Apesar dessa variação acentuada, foi possível identificar tendências de melhor desempenho entre os meios avaliados. O MSM1 destacou-se como o meio mais eficiente para emulsificação das amostras ADC37, SDA5 e SDA8, que apresentaram valores entre 30% e 60%. Por outro lado, o MSM2 mostrou-se mais favorável para as amostras ADC34, ADC35, SDA3 e SDA13, em que os índices variaram entre 30% e 40%, indicando desempenho relativamente mais consistente nesse meio.

Embora as variações entre triplicatas e meios de cultura tenham sido expressivas, os resultados mostram que todas as amostras apresentaram algum nível de emulsificação

em pelo menos um dos meios testados. Assim, mesmo diante da variabilidade observada, é possível confirmar a capacidade emulsificante das cepas.

5.5.2 Tensão superficial

A avaliação da atividade tensoativa dos biossurfactantes foi realizada por meio da medida da tensão superficial das amostras produzidas em três meios de cultura distintos para produção de ramnolipídeo (MSM1, MSM2 e MSM3) (Figura 10). O controle negativo utilizado foi água ultrapura e os meios de cultura puros. Os valores obtidos demonstraram que a maioria das amostras foram capazes de reduzir a tensão superficial em relação aos controles (água purificada e o meio de cultura usado em cada cultivo), que permaneceram próximos a 72 mN/m, conforme esperado para soluções sem presença de compostos tensoativos (figura 10). Essa diferença indica que diversas cepas apresentaram potencial para produzir metabólitos com propriedades surfactantes.

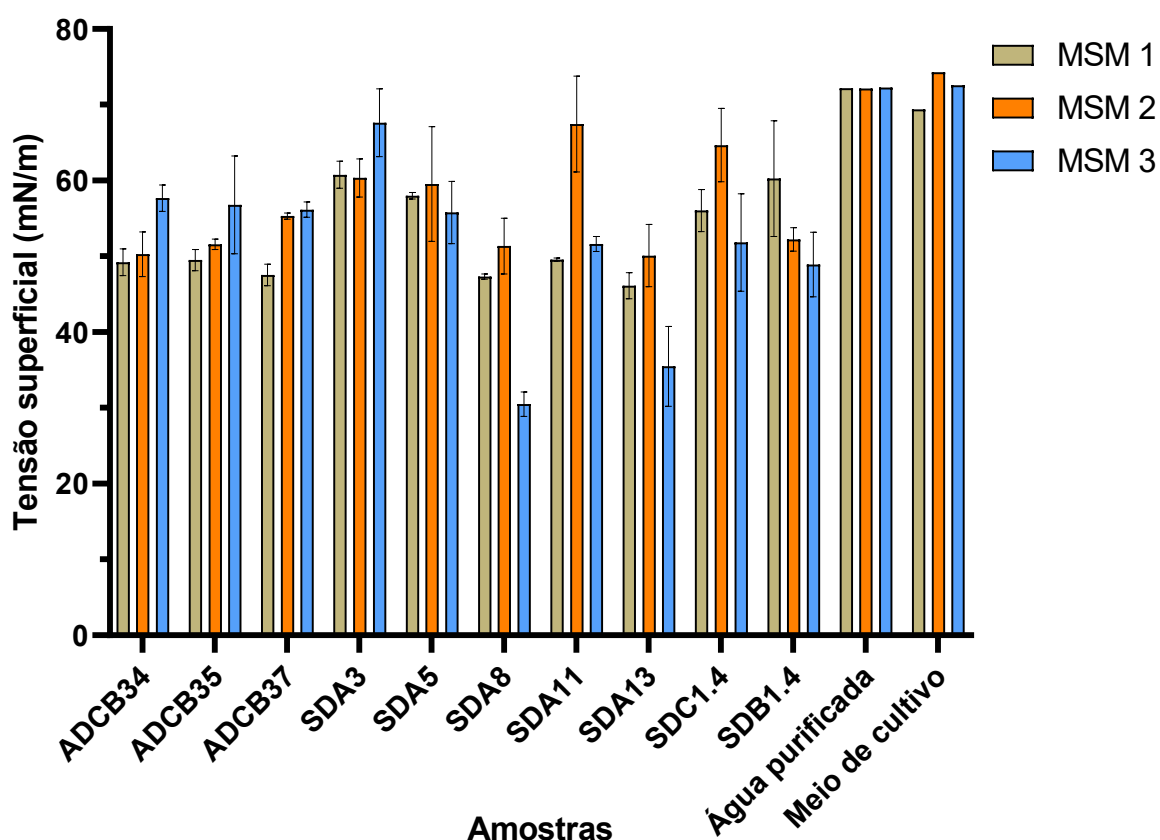


Figura 10: Valores de tensão superficial do sobrenadante bruto contendo biossurfactantes produzidos em MSM1 (cor verde), MSM2 (cor laranja) e MSM3 (cor azul). O controle negativo utilizado foi água purificada e o meio de cultura no qual o cultivo foi realizado.

O meio MSM3 destacou-se por promover a maior redução da tensão superficial entre os meios testados. A amostra SDA8 apresentou o menor valor registrado, cerca de 30 mN/m, enquanto nos demais meios seu valor médio permaneceu próximo de 47 mN/m. De forma semelhante, a amostra SDA13 também apresentou um desempenho superior nesse meio, reduzindo a tensão superficial para aproximadamente 35 mN/m. As amostras SDA5, SDC1.4 e SDB1.4 também apresentaram no MSM3 os menores valores medidos, com média em torno de 50 mN/m.

Por outro lado, as amostras ADCB34, ADCB35 e ADCB37 tiveram seus melhores resultados no MSM1, com valores variando entre 45 e 50 mN/m. A amostra SDA11 também apresentou menor tensão superficial nesse meio, registrando aproximadamente 49 mN/m. Diferindo das demais, apenas a amostra SDA3 apresentou sua menor redução de tensão superficial no MSM2.

Comparando os resultados de tensão superficial nos diferentes meios de cultura, é possível observar que as amostras SDA5, SDA8, SDA13, SDC1.4 e SDB1.4 apresentaram os menores valores de tensão superficial quando cultivadas no meio MSM3, indicando maior redução nesse meio em comparação aos demais. Por outro lado, as amostras ADCB34, ADCB35, ADCB37 e SDA11 exibiram menor redução da tensão superficial no meio MSM1. Apenas a amostra SDA3 apresentou sua menor redução de tensão superficial no meio MSM2.

Embora nenhuma das amostras tenha alcançado valores inferiores a 30 mN/m, faixa associada a produtores altamente eficientes, diversas cepas mostraram reduções consistentes, indicando produção moderada de biossurfactantes. Entre elas, destacam-se as amostras ADC37 no meio MSM1, SDA8 nos meios MSM3 e MSM1, SDA13 nos meios MSM3 e MSM1 e a amostra SDB1.4 no MSM3. Sendo o MSM3 o meio que apresentou o maior número de amostras com maior redução de tensão superficial.

6. DISCUSSÃO

Com o aumento da demanda por alternativas ecologicamente sustentáveis aos surfactantes sintéticos, os biosurfactantes passaram a se destacar como compostos de grande interesse industrial. Nesse contexto, o isolamento de novas cepas produtoras desses compostos é essencial para ampliar o repertório de microrganismos disponíveis para aplicações biotecnológicas (Ghazi Faisal *et al.*, 2023b).

O presente estudo buscou isolar cepas de *Pseudomonas* provenientes de ambientes naturais com menor risco associado a patogenicidade, priorizando áreas de preservação ambiental no Rio de Janeiro, como a Praia de Grumari e a Cachoeira das Almas. Por serem regiões com reduzido impacto antropogênico, esses locais tendem a abrigar cepas de *Pseudomonas* que apresentam menor relevância clínica e que, portanto, demandam níveis menos restritivos de biossegurança quando comparadas a espécies como *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, tais ambientes constituem fontes promissoras de microrganismos potencialmente capazes de produzir metabólitos de interesse industrial.

Vale salientar que a escolha de amostras de água e sedimento como fontes de isolamento se mostrou adequada, uma vez que esses tipos de amostras são amplamente utilizados em estudos de bioprospecção de cepas *Pseudomonas*. Esses ambientes representam nichos onde bactérias pertencentes a este gênero podem ser encontradas (Alvarado-Campo *et al.*, 2023; Phulpoto *et al.*, 2021b).

A primeira etapa deste trabalho envolveu a seleção de meios de cultura voltados ao isolamento de bactérias do gênero *Pseudomonas*, especialmente aquelas de origem ambiental. Foram utilizados meios com diferentes graus de seletividade, como descrito previamente na Seção 4.1. Entre eles, destacam-se o Ágar ACC, o Ágar Acetamida Cetrimide Glicerol Manitol e o Ágar *Buffered Marine Yeast*, todos reconhecidos por favorecerem o crescimento de espécies ambientais de *Pseudomonas*. (Atlas, 2010). Além desses, empregou-se o Ágar Cetrimide, tradicionalmente indicado para o isolamento de bactérias do gênero *Pseudomonas*, principalmente a *Pseudomonas aeruginosa* e o Ágar MacConkey, seletivo para bactérias gram-negativas.

Os resultados de isolamento mostraram que os meios Cetrimide e MacConkey foram os mais produtivos, resultando em 31 e 21 colônias isoladas, respectivamente. Esse desempenho do meio MacConkey era esperado, uma vez que favorece o crescimento de bactérias gram-negativas, grupo que se mostrou predominante entre os isolados conforme confirmado pela coloração de Gram. Além disso, o maior número de isolados em Cetrimide

reforça a relevância desse meio para busca inicial de espécies de *Pseudomonas*. Embora o meio Cetrimide seja tradicionalmente mais seletivo para *Pseudomonas aeruginosa*, ele também pode permitir o crescimento de outras espécies ambientais do gênero, o que o torna útil como ponto de partida em estudos de isolamento não direcionados exclusivamente a patogênicas. Esses achados vão de encontro com os dados observados na literatura onde podemos observar que o meio de centrimide pode atuar como um ótimo ponto de partida em estudos de isolamento não direcionados exclusivamente a patogênicas (Gamze Yilmaz *et al.*, 2017)

A partir dos resultados de isolamento e da identificação por MALDI-TOF, verificou-se que as cepas do gênero *Pseudomonas* foram obtidas exclusivamente nas amostras coletadas na Cachoeira das Almas, tanto de água (5 isolados) quanto de sedimento (7 isolados). Nenhuma cepa desse gênero foi recuperada nas amostras provenientes da Praia de Grumari.

Ambientes de água doce, como a Cachoeira das Almas, geralmente apresentam maior densidade e diversidade de *Pseudomonas* quando comparados a ambientes marinhos. A maioria das espécies desse gênero prefere condições de baixa salinidade, maior disponibilidade de matéria orgânica biodisponível, pH relativamente estável e temperaturas mais moderadas, condições que predominam em ambientes dulcícolas (Phulpoto *et al.*, 2021). Esses fatores favorecem o desenvolvimento de espécies identificadas neste estudo, como *P. putida*, *P. chlororaphis* e *P. wayambapalatensis*, que são comumente associadas a solos, água doce e sedimentos ricos em nutrientes (Alvarado-Campo *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2022; Wittgens *et al.*, 2018).

O sedimento da cachoeira também contribuiu para o maior número de isolados, por se tratar de um ambiente naturalmente enriquecido em matéria orgânica. Esse tipo de substrato costuma apresentar comunidades microbianas com predominância de bactérias ambientais não patogênicas, diferentemente dos sedimentos marinhos, que tendem a ser menos diversos nesse grupo (Wang *et al.*, 2012).

Embora algumas espécies de *Pseudomonas* tolerem salinidade, sua abundância no ambiente marinho costuma ser menor (El-Malah *et al.*, 2023). Assim, cepas desse gênero podem estar presentes na Praia de Grumari, porém em concentrações reduzidas, o que impossibilita sua recuperação pelos métodos empregados. Além disso, observou-se um número elevado de bactérias do gênero *Enterobacter* obtidos, principalmente, nas amostras de ambiente marinho. A predominância desse grupo sugere ele pode ter se estabelecido

como uma comunidade competitiva e numericamente superior, o que possivelmente dificultou o isolamento de *Pseudomonas*, seja por competição ecológica direta ou pela diferença na abundância relativa (Nimnoi e Pongsilp, 2022).

Portanto, a ausência de *Pseudomonas* na Praia de Grumari e a predominância dessas bactérias na Cachoeira das Almas podem refletir características ambientais específicas de cada local. Esses resultados indicam que ecossistemas de água doce representam nichos mais favoráveis à detecção e ao isolamento de bactérias do gênero *Pseudomonas*.

Como o objetivo central deste estudo foi identificar cepas de *Pseudomonas* com capacidade de produzir biossurfactantes, a avaliação da atividade tensoativa constituiu uma etapa essencial da análise. Dessa forma, os testes de tensão superficial foram conduzidos para verificar se as cepas isoladas eram capazes de secretar metabólitos com propriedades surfactantes, evidenciados pela redução da tensão superficial do meio. A diminuição da tensão superficial funciona como um indicativo direto da produção de compostos tensoativos e permite avaliar o potencial biotecnológico de cada cepa para aplicações envolvendo biossurfactantes (Biktasheva *et al.*, 2024a).

A atividade tensoativa observada entre as amostras testadas demonstrou que a maioria das cepas foi capaz de reduzir a tensão superficial em comparação aos controles, que permaneceram próximos a 72 mN/m, conforme esperado na ausência de compostos surfactantes. Esse resultado indica que diversas das cepas isoladas apresentam potencial para a produção de biossurfactantes, ainda que em níveis moderados. A variação nos valores de tensão superficial entre os três meios mínimos de sais (MSM1, MSM2 e MSM3) sugere que as diferenças na composição nutricional influenciaram de forma significativa a síntese desses metabólitos.

Entre os meios avaliados, o MSM3 se destacou por promover as maiores reduções de tensão superficial para as amostras SDA5, SDA8, SDA13, SDC1.4 e SDB1.4. A maior concentração de fonte de carbono presente nesse meio, composta por 50 g/L de glicerol, representa uma hipótese plausível para o desempenho superior observado, assim como a utilização de nitrato de sódio (NaNO_3) como fonte de nitrogênio. Estudos indicam que a síntese de ramnolipídeos por *Pseudomonas* depende fortemente da relação C/N, sendo que concentrações elevadas de carbono tendem a induzir a rota biossintética desses compostos (Mat'átková *et al.*, 2022). Outro aspecto que provavelmente contribuiu para o bom desempenho do MSM3 é o fato de esse meio ter sido originalmente otimizado para a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa*. Esse histórico de formulação

proporciona condições nutricionais e físico-químicas que favorecem a ativação das vias biossintéticas envolvidas na síntese de compostos tensoativos, o que pode explicar a resposta positiva das cepas analisadas (Pereira *et al.*, 2013).

O MSM2 apresentou um conjunto mais complexo de nutrientes, incluindo ureia como fonte de nitrogênio, NaCl e uma solução composta por oligoelementos. No entanto, apesar dessa composição rica, muitas amostras não exibiram reduções significativas na tensão superficial nesse meio. Esse comportamento pode estar associado ao efeito inibitório decorrente do excesso de sais ou ao estresse osmótico provocado pelo NaCl, que pode reduzir a taxa metabólica de algumas espécies de *Pseudomonas* ambientais não adaptadas a condições salinas (Bazire *et al.*, 2009). Além disso, a concentração de glicerol é menor (20g.L^{-1}), o que reduz a disponibilidade energética necessária para a síntese de biossurfactantes em algumas cepas (Saikia *et al.*, 2012). Esse conjunto de fatores pode explicar por que apenas a amostra SDA3 apresentou um melhor desempenho no MSM2, o que sugere que essa cepa possui uma fisiologia mais tolerante a variações osmóticas ou depende, em maior grau, da presença de oligoelementos para melhorar seu metabolismo.

A faixa geral de redução de tensão superficial observada foi entre aproximadamente 31 e 70 mN/m, que indica que algumas cepas produziram tensoativos e outras não. Embora nenhuma cepa tenha atingido valores abaixo de 30 mN/m, típicos de produtores altamente eficientes como algumas *Pseudomonas aeruginosa* como demonstrado por Phulpoto em 2021, a produção observada é coerente com perfis de *Pseudomonas* ambientais não patogênicas (Biktasheva *et al.*, 2022). Assim, os valores encontrados reforçam a hipótese de que há variedade metabólica significativa entre as cepas isoladas, dessa forma torna-se necessária a avaliação de cada cepa individualmente, otimizando os meios de cultura, ajustando fatores nutricionais e de cultivo para que seja possível encontrar valores mais relevantes.

Entre os destaques, identificou-se que ADCB37 no MSM1, SDA8 e SDA13 no MSM3 e MSM1, e SDB1.4 no MSM3 se comportaram consistentemente como as melhores produtoras em ao menos um dos meios testados. Esse padrão sugere que cada cepa responde de forma específica às condições nutricionais, reforçando que é necessário a otimização da produção de biossurfactantes de cada cepa.

A eficiência das emulsões foi avaliada a partir da análise dos índices de emulsificação obtidos a partir dos sobrenadantes produzidos em diferentes meios de cultivo e formadas com diferentes óleos (óleo de soja e hexadecano). De modo geral, observou-se

que o desempenho das amostras variou significativamente conforme o tipo de óleo utilizado e o meio de cultura no qual foi obtido o sobrenadante.

Os resultados obtidos com óleo de soja apresentaram maior estabilidade e menor variação entre as triplicatas, principalmente no MSM2, que se destacou como o meio mais favorável para a produção de moléculas emulsificantes. A maior consistência observada nesse meio sugere que sua composição nutricional favorece a síntese de metabólitos capazes de formar emulsões, provavelmente devido à indução de biossurfactantes com maior afinidade por compostos lipídicos complexos, como os presentes no óleo vegetal (Biktasheva *et al.*, 2024b). Além disso, os índices entre 45% e 51% encontrados para a maioria das amostras reforçam que tanto o MSM1 quanto o MSM2 sustentam a produção de biossurfactantes com atividade considerável, enquanto o MSM3 apresentou desempenho inferior para óleo de soja.

Em contraste, os valores de emulsificação em n-hexadecano apresentaram maior dispersão e menor reprodutibilidade, especialmente no MSM3, onde várias amostras exibiram desvios padrão elevados. Essa instabilidade pode estar relacionada às características físico-químicas do hexadecano, um hidrocarboneto linear de baixa polaridade, cuja interação com biossurfactantes depende de estruturas moleculares específicas (Andreolli *et al.*, 2023). A alta variabilidade também sugere que parte dos biossurfactantes produzidos pode ter sido mais eficiente com substratos complexos (como óleo de soja) do que com hidrocarbonetos puros. A amostra SDC1.4 é um exemplo claro dessa sensibilidade ao meio e ao óleo, apresentando desempenho completamente distinto entre MSM2 e MSM3.

Apesar da variabilidade, foi possível identificar tendências de seletividade por meio. No hexadecano, o MSM1 favoreceu a atividade das amostras ADC37, SDA5 e SDA8, enquanto o MSM2 apresentou maiores resultados para ADCB34, ADCB35, SDA3 e SDA13, indicando que diferentes perfis metabólicos podem ser estimulados em cada composição de meio. Esses achados reforçam que a produção de biossurfactantes não é apenas dependente da espécie, mas também fortemente condicionada pelo ambiente nutricional.

A observação de que todas as amostras apresentaram algum grau de emulsificação em pelo menos um meio e com pelo menos um dos óleos demonstra que os isolados possuem potencial bioemulsificante, embora a eficiência seja influenciada por múltiplos fatores. Em conjunto, os resultados destacam a importância de testar diferentes fases

hidrofóbicas e condições de cultivo para identificar combinações mais adequadas tanto para estudos de caracterização quanto para aplicações biotecnológicas futuras.

A etapa de sequenciamento e análise de afiliação taxonômica permitiu validar de forma mais robusta as identificações previamente realizadas por MALDI-TOF, o que reforçou a confiabilidade dos dados obtidos ao longo do estudo. Como o gênero *Pseudomonas* apresenta grande diversidade, o sequenciamento do gene *rrs* (16S rRNA) foi essencial para confirmar a classificação das cepas e fornecer maior resolução em nível de espécie.

Os resultados revelaram que todas as demais cepas pertencem de fato ao gênero *Pseudomonas*, o que corrobora as análises anteriores por MALDI-TOF. A predominância de linhagens com maior similaridade a *P. wayambapalatensis* (sete isolados) indica que essa espécie, ainda que pouco descrita na literatura e sem evidências específicas de produção de biossurfactantes, pode ser mais frequente em ambientes de água doce e sedimento preservados, como o local selecionado para o isolamento.

A presença de cepas relacionadas a *P. putida* e *P. chlororaphis*, espécies reconhecidas pela segurança ambiental e ampla versatilidade metabólica, reforça a relevância dos isolados obtidos. Essas bactérias são frequentemente descritas como produtoras de compostos bioativos e capazes de degradar diversas fontes de carbono, características desejáveis para a produção de biossurfactantes em processos sustentáveis (Liu *et al.*, 2022; Nikel e de Lorenzo, 2018; Wittgens *et al.*, 2018). Por sua vez, as duas cepas que apresentaram maior similaridade com *Pseudomonas saponiphila* acrescentam diversidade metabólica ao conjunto de isolados, uma vez que essa espécie é associada à degradação de compostos hidrofóbicos e pode, portanto, possuir rotas biossintéticas específicas para a produção de tensoativos microbianos. (Occhipinti *et al.*, 2018) .

Outro ponto relevante é que o sequenciamento permitiu observar que, mesmo dentro de um grupo taxonômico relativamente restrito, há diversidade significativa entre as cepas. Isso é fundamental em estudos de bioprospecção, pois diferentes espécies e até diferentes linhagens dentro da mesma espécie podem apresentar capacidades distintas de produção de biossurfactantes, bem como tensoativos com diferentes propriedades (Oliveira *et al.*, 2021). Assim, a confirmação taxonômica obtida por meio do sequenciamento, aliada aos dados de atividade tensoativa, amplia a compreensão sobre o potencial funcional das cepas isoladas e oferece informações importantes para a seleção de cepas promissoras para estudos futuros.

Como a análise de afiliação taxonômica revelou um grupo composto por sete cepas com alta similaridade à espécie *Pseudomonas wayambapalatensis*, tornou-se necessário avaliar se essa proximidade filogenética indicava que essas cepas eram clones. Para isso, realizou-se a tipagem molecular por ERIC-PCR, técnica amplamente empregada para discriminar linhagens bacterianas com alta resolução. Os perfis de bandas obtidos permitiram comparar diretamente os padrões genômicos das cepas, fornecendo uma visão mais detalhada do grau de similaridade presente no conjunto de isolados (Hematzadeh e Haghighi, 2021; Louws *et al.*, 1994).

A análise dos padrões gerados revelou que as cepas ADCB37, ADCB38 e ADCB39 apresentaram perfis praticamente idênticos, o que sugere fortemente que se trata de possíveis clones. Esse resultado é consistente com o fato de essas amostras terem sido coletadas no mesmo local e no mesmo meio de cultivo, diferindo apenas quanto ao grau de diluição utilizado durante o isolamento. Em contraste, todas as demais amostras exibiram padrões de bandas distintos entre si, indicando que, apesar da proximidade filogenética observada no sequenciamento parcial do gene *rrs*, há variabilidade genética entre as bactérias isoladas. Esse achado é particularmente relevante em estudos de prospecção, pois demonstra que mesmo cepas pertencentes ao mesmo grupo taxonômico podem apresentar diferenças genômicas marcantes, potencialmente associadas a características metabólicas e produtivas distintas, incluindo a síntese de biossurfactantes (Nayarisseri e Singh, 2023; Soberón-Chávez *et al.*, 2021).

Assim, a tipagem molecular por ERIC-PCR complementou as análises taxonômicas ao evidenciar que o conjunto de isolados apresenta diversidade genética expressiva, fortalecendo o valor biotecnológico do grupo e sugerindo a existência de linhagens únicas com potenciais diferentes para a produção de biossurfactantes.

7. CONCLUSÕES

- Foram isoladas ao total 12 cepas de bactérias do gênero *Pseudomonas*, sendo todas isoladas do ambiente de água doce (amostras da cachoeira das almas).
- Todas as cepas avaliadas apresentaram potencial para produção de biossurfactantes, demonstrado pelos valores de tensão superficial e índices de emulsificação obtidos nos diferentes meios de cultura.
- O meio MSM3 foi o mais eficiente na produção de biossurfactante com capacidades de redução da tensão superficial, concentrando a maioria dos menores valores registrados e destacando-se como o meio mais favorável para a produção de biossurfactantes com maior atividade redutora de tensão.
- Os meios MSM1 e MSM2 mostraram melhor desempenho para a produção de biossurfactantes com capacidade de realizar emulsão em óleo de soja, com destaque para o MSM2, que apresentou maior consistência entre as triplicatas e os maiores índices de emulsificação para a maioria das amostras.
- A emulsificação em n-hexadecano apresentou maior variabilidade, indicando menor estabilidade e reprodutibilidade das emulsões quando essa fase hidrofóbica é utilizada.
- Mesmo com variações expressivas entre triplicatas e diferentes meios, todas as amostras apresentaram emulsificação em pelo menos uma condição testada, confirmando o potencial das cepas como produtoras de biossurfactantes.
- Este estudo contribui para a seleção inicial de isolados com maior potencial biotecnológico, indicando candidatos promissores para etapas posteriores de purificação, caracterização química e aplicação industrial.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.B. Vermelho, Pereira, A. F., Souto-Padrón, T. C. B., & Coelho, R. R. (2006). *Microscopia de microrganismos*. In *Práticas de Microbiologia* (1ª ed., pp. 79–128). Guanabara Koogan.
- Abdel-Mawgoud, A. M., Aboulwafa, M. M., & Hassouna, N. A. H. (2009). Characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolate Bs20. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(2), 329–345. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8285-1>
- Abdel-Mawgoud, A. M., Lépine, F., & Déziel, E. (2010). Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(5), 1323–1336. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2498-2>
- Adnan, M., Siddiqui, A. J., Hamadou, W. S., Ashraf, S. A., Hassan, M. I., Snoussi, M., Badraoui, R., Jamal, A., Bardakci, F., Awadelkareem, A. M., Sachidanandan, M., & Patel, M. (2021). Functional and structural characterization of *Pediococcus pentosaceus*-derived biosurfactant and its biomedical potential against bacterial adhesion, quorum sensing, and biofilm formation. *Antibiotics*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111371>
- Alsohim, A. S., Taylor, T. B., Barrett, G. A., Gallie, J., Zhang, X. X., Altamirano-Junqueira, A. E., Johnson, L. J., Rainey, P. B., & Jackson, R. W. (2014). The biosurfactant viscosin produced by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 aids spreading motility and plant growth promotion. *Environmental Microbiology*, 16(7), 2267–2281. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12469>
- Alvarado-Campo, K. L., Quintero, M., Cuadrado-Cano, B., Montoya-Giraldo, M., Otero-Tejada, E. L., Blandón, L., Sánchez, O., Zuleta-Correa, A., & Gómez-León, J. (2023). Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from coastal marine sediments and their lead removal potential. *Microorganisms*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112708>
- Ambaye, T., Vaccari, M., Prasad, S., & Rtimi, S. (2021). Preparation, characterization and application of biosurfactant in various industries: A critical review on progress, challenges and perspectives. *Applied Spectroscopy Reviews*, 58(3), 206–234. <https://doi.org/10.1080/05704928.2021.1955702>
- Andreolli, M., Villanova, V., Zanzoni, S., D’Onofrio, M., Vallini, G., Secchi, N., & Lampis, S. (2023). Characterization of trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine strain *Rhodococcus* sp. SP1d and its potential for environmental applications. *Microbial Cell Factories*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02128-9>
- Atlas, R. (2010). *Handbook of microbiological media* (4th ed.). CRC Press.
- Barros, F. F. C., Pereira de Quadros, C., Roberto, M., Júnior, M., & Pastore, G. M. (2007). Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova*, 30(2).
- Bazire, A., Diab, F., Taupin, L., Rodrigues, S., Jebbar, M., & Dufour, A. (2009). Effects of osmotic stress on rhamnolipid synthesis and time-course production of cell-to-cell signal molecules by *Pseudomonas aeruginosa*. *The Open Microbiology Journal*, 3.
- Berry, J. D., Neeson, M. J., Dagastine, R. R., Chan, D. Y. C., & Tabor, R. F. (2015). Measurement of surface and interfacial tension using pendant drop tensiometry. *Journal of Colloid and Interface Science*, 454, 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.05.012>
- Biktasheva, L., Gordeev, A., Kirichenko, A., Kuryntseva, P., & Selivanovskaya, S. (2024). Screening of microorganisms from wastes and identification of the optimal substrate for biosurfactant production. *Microbiology Research*, 15(1), 152–163. <https://doi.org/10.3390/microbiolres15010010>
- Biktasheva, L., Gordeev, A., Selivanovskaya, S., & Galitskaya, P. (2022). Di- and monorhamnolipids produced by the *Pseudomonas putida* PP021 isolate significantly enhance the degree of recovery of heavy oil from the Romashkino Oil Field (Tatarstan, Russia). *Processes*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/pr10040779>
- Blunt, W., Blanchard, C., & Morley, K. (2022). Effects of environmental parameters on microbial rhamnolipid biosynthesis and bioreactor strategies for enhanced productivity. *Biochemical Engineering Journal*, 182, 108436.

- Brigodiot, C., Marsiglia, M., Dalmazzone, C., Schroën, K., & Colin, A. (2024). Studying surfactant mass transport through dynamic interfacial tension measurements: A review of the models, experiments, and the contribution of microfluidics. *Advances in Colloid and Interface Science*, 103239.
- Brumano, L. P., Soler, J., & Silva, A. J. (2016). Recent advances in sustainable production and application of biosurfactants in Brazil and Latin America. *Industrial Biotechnology*, 12(1), 31–39.
- C. F. C., & T. K. (2024). Advances in stabilization of metallic nanoparticle with biosurfactants: A review on current trends. *Heliyon*, 10(9). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29773>
- C., & Bui, X. T. (2021). A critical review on various feedstocks as sustainable substrates for biosurfactants production: A way towards cleaner production. *Microbial Cell Factories*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01613-3>
- Ceresa, C., Fracchia, L., Sansotera, A. C., De Rienzo, M. A. D., & Banat, I. M. (2023). Harnessing the potential of biosurfactants for biomedical and pharmaceutical applications. *Pharmaceutics*, 15(8), 2156.
- Cerqueira dos Santos, S., Araújo Torquato, C., de Alexandria Santos, D., Orsato, A., Leite, K., Serpeloni, J. M., Losi-Guembarski, R., Romão Pereira, E., Dyna, A. L., Lopes Barboza, M. G., Fernandes Arakawa, M. H., Pires Bitencourt, J. A., da Cruz Silva, S., da Silva Sá, G. C., Dias Rodrigues, P., Quintella, C. M., & Faccin-Galhardi, L. C. (2024). Production and characterization of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* isolated in the Amazon region, and potential antiviral, antitumor, and antimicrobial activity. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54828-w>
- Chauhan, M., Kimothi, A., Sharma, A., & Pandey, A. (2023). Cold adapted *Pseudomonas*: ecology to biotechnology. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1218708>.
- Chang, J., Bui, X., Rakholiya, P., Ngo, H., Ng, H., Varjani, S., You, S., Teixeira, J., Taherzadeh, M., & Wong, J. (2021). Bio-based rhamnolipids production and recovery from waste streams: Status and perspectives. *Bioresource Technology*, 319, 124213. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124213>
- Chauhan, M., Kimothi, A., Sharma, A., & Pandey, A. (2023). Cold adapted *Pseudomonas*: Ecology to biotechnology. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1218708>
- Cooper, D. G., & Goldenberg, B. G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Craig, K., Johnson, B. R., & Grunden, A. (2021). Leveraging *Pseudomonas* stress response mechanisms for industrial applications. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.660134>
- Cui, T., Wang, P., Li, J., Su, Y. M., Liu, N., & Hong, M. (2023). Effects of temperature, pH, and salinity on the growth kinetics of *Pseudomonas* sp. NB-1, a newly isolated cold-tolerant, alkali-resistant, and high-efficiency nitrobenzene-degrading bacterium. *Environmental Technology*, 44(14), 2171–2183. <https://doi.org/10.1080/09593330.2021.2024886>
- Current Opinion in Colloid & Interface Science. (2023). *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 69, 101780. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2023.101780>
- Daltin, D. (2011). Introdução e primeiros conceitos. In *Tensoativos: Química, propriedades e aplicações* (Vol. 1, pp. 1–43).
- Dardouri, M., Mendes, R. M., Frenzel, J., Costa, J., & Ribeiro, I. A. C. (2021). Seeking faster, alternative methods for glycolipid biosurfactant characterization and purification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03387-4>
- De Clercq, V., Roelants, S. L. K. W., Castelein, M. G., De Maeseneire, S. L., & Soetaert, W. K. (2021). Elucidation of the natural function of sophorolipids produced by *Starmerella bombicola*. *Journal of Fungi*, 7(11). <https://doi.org/10.3390/jof7110917>
- Dini, S., Bekhit, A. E. D. A., Roohinejad, S., Vale, J. M., & Agyei, D. (2024). The physicochemical and functional properties of biosurfactants: A review. *Molecules*, 29(11). <https://doi.org/10.3390/molecules29112544>

- Dobler, L., Almeida, R. V., Freire, D. M. G., & Universidade Federal do Rio de Janeiro. (2018). *Produção de raminoipídeos por Pseudomonas aeruginosa-estA, suas características físico-químicas, toxicidade e simulação em vazamento de petróleo*. UFRJ.
- Drakontis, C. E., & Amin, S. (2020). Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 48, 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.03.013>
- El-Malah, S. S., Rasool, K., Jabbar, K. A., Sohail, M. U., Baalousha, H. M., & Mahmoud, K. A. (2023). Marine bacterial community structures of selected coastal seawater and sediment sites in Qatar. *Microorganisms*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122827>
- Ghazi Faisal, Z., Sallal Mahdi, M., & Alobaidi, K. H. (2023a). Optimization and chemical characterization of biosurfactant produced from a novel *Pseudomonas guguanensis* strain Iraqi ZG.K.M. *International Journal of Microbiology*, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/1571991>
- Ghosh, S., Ray, A., & Pramanik, N. (2020). Self-assembly of surfactants: An overview on general aspects of amphiphiles. *Biophysical Chemistry*, 265, 106429. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2020.106429>
- Gonçalves, R. A., Holmberg, K., & Lindman, B. (2023). Cationic surfactants: A review. *Journal of Molecular Liquids*, 375, 121335. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.121335>
- Guimarães, C. R., Pasqualino, I. P., de Sousa, J. S., Nogueira, F. C. S., Seldin, L., de Castilho, L. V. A., & Freire, D. M. G. (2021). *Bacillus velezensis* H2O-1 surfactin efficiently maintains its interfacial properties in extreme conditions found in post-salt and pre-salt oil reservoirs. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 208, 112072. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112072>
- Guzmán, E., Ortega, F., & Rubio, R. G. (2024). Exploring the world of rhamnolipids: A critical review of their production, interfacial properties, and potential application.
- Hayes, D., & Solaiman, D. (2019). *Biobased surfactants: Synthesis, properties, and applications* (2nd ed.).
- Hematzadeh, A., & Haghighi, M. (2021). Biotyping of isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human infections by RAPD and ERIC-PCR. *Heliyon*, 7(9), e07967. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07967>
- Holmberg, K. (2002). *Surfactants and polymers in aqueous solution* (2nd ed.).
- Jahan, R., Bodratti, A. M., Tsianou, M., & Alexandridis, P. (2020). Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 275, 102061. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>
- Jozanović, M., Sakač, N., Karnaš, M., & Medvidović-Kosanović, M. (2021). Potentiometric sensors for the determination of anionic surfactants – A review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 51(2), 115–137. <https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1684236>
- Karaš, M. A., Wdowiak-Wróbel, S., Marek-Kozaczuk, M., Sokołowski, W., Melianchuk, K., & Komanińska, I. (2023). Assessment of phenanthrene degradation potential by plant-growth-promoting endophytic strain *Pseudomonas chlororaphis* 23aP isolated from *Chamaecytisus albus* (Hacq.) Rothm. *Molecules*, 28(22), 7581. <https://doi.org/10.3390/molecules28227581>
- Khan, R. A. (2022). Detergents. In *Environmental micropollutants* (pp. 117–130). Elsevier.
- Kubicki, S., Bollinger, A., Katzke, N., Jaeger, K. E., Loeschke, A., & Thies, S. (2019). Marine biosurfactants: Biosynthesis, structural diversity and biotechnological applications. *Marine Drugs*, 17(7), 408. <https://doi.org/10.3390/md17070408>
- Liu, F., Yang, S., Xu, F., Zhang, Z., Lu, Y., Zhang, J., & Wang, G. (2022). Characteristics of biological control and mechanisms of *Pseudomonas chlororaphis* ZM-1 against peanut stem rot. *BMC Microbiology*, 22(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02420-x>

- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., & de Bruijn, F. J. (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(7), 2286–2295. <https://journals.asm.org/journal/aem>
- Mabrouk, M. M., Hamed, N. A., & Mansour, F. R. (2023). Spectroscopic methods for determination of critical micelle concentrations of surfactants: A comprehensive review.
- Marchant, R., & Banat, I. M. (2012). Biosurfactants: A sustainable replacement for chemical surfactants *Biotechnology Letters*, 34(9), 1597–1605. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0956-x>
- Mat'átková, O., Michailidu, J., Ježdík, R., Kolouchová, I. J., Řezanka, T., Jirků, V., & Masák, J. (2022). Production and characterization of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* DBM 3774: Response surface methodology approach. *Microorganisms*, 10(7), 1272. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071272>
- Miao, Y., To, M. H., Siddiqui, M. A., Wang, H., Lodens, S., Chopra, S. S., Kaur, G., Roelants, S. L. K. W., & Lin, C. S. K. (2024). Sustainable biosurfactant production from secondary feedstock: Recent advances, process optimization and perspectives. *Frontiers in Chemistry*, 12, 1327113. <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1327113>
- Michalska, J., Piński, A., Zur, J., & Mroziński, A. (2020). Selecting bacteria candidates for the bioaugmentation of activated sludge to improve the aerobic treatment of landfill leachate. *Water*, 12(1), 104. <https://doi.org/10.3390/w12010140>
- Muslu, S., Genc, B., Adiguzel, M., Albayrak, S., & Adiguzel, A. (2020). Proteolytic, lipolytic and amylolytic bacteria reservoir of Turkey: Cold-adaptive bacteria in detergent industry. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 14(1), 63–72. <https://doi.org/10.22207/JPAM.14.1.09>
- Myers, D. (2006). *Surfactant science and technology* (3rd ed.). Wiley.
- Nagtode, V. S., Cardoza, C., Yasin, H. K. A., Mali, S. N., Tambe, S. M., Roy, P., Singh, K., Goel, A., Amin, P. D., Thorat, B. R., Cruz, J. N., & Pratap, A. P. (2023). Green surfactants (biosurfactants): A petroleum-free substitute for sustainability – Comparison, applications, market, and future prospects. *ACS Omega*, 8(13), 11674–11699. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00591>
- Nayariseri, A., & Singh, S. K. (2023). Genome analysis of biosurfactant producing bacterium, *Bacillus tequilensis*. *PLoS ONE*, 18(6), e0285994. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0285994>
- Nikel, P. I., & de Lorenzo, V. (2018). *Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: From native biochemistry to trans-metabolism. *Metabolic Engineering*, 50, 142–155. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.005>
- Nimnoi, P., & Pongsilp, N. (2022). Identification, characterization, and virulence gene expression of marine enterobacteria in the Upper Gulf of Thailand. *Microorganisms*, 10(3), 511. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030511>
- Nitschke, M., Gláucia, E., & Pastore, M. (2002). Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. *Química Nova*, 25(5), 772–776.
- Occhipinti, A., Eyassu, F., Rahman, T. J., Rahman, P. K. S. M., & Angione, C. (2018). In silico engineering of *Pseudomonas* metabolism reveals new biomarkers for increased biosurfactant production. *PeerJ*, 6, e6046. <https://doi.org/10.7717/peerj.6046>
- Oliveira, E. M., Sales, V. H. G., Andrade, M. S., Zilli, J. É., Borges, W. L., & Souza, T. M. (2021). Isolation and characterization of biosurfactant-producing bacteria from Amapaense Amazon soils. *International Journal of Microbiology*, 2021, 9959550. <https://doi.org/10.1155/2021/9959550>
- Orellana-Saez, M., Pacheco, N., Costa, J. I., Mendez, K. N., Miossec, M. J., Meneses, C., Castro-Nallar, E., Marcoleta, A. E., & Poblete-Castro, I. (2019). In-depth genomic and phenotypic characterization of the antarctic psychrotolerant strain *Pseudomonas* sp. MPC6 reveals unique metabolic features, plasticity, and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01154>

- Otzen, D. (2017). *Biosurfactants and surfactants interacting with membranes and proteins: Same but different?* Elsevier.
- Pardhi, D. S., Panchal, R. R., Raval, V. H., Joshi, R. G., Poczai, P., Almalki, W. H., & Rajput, K. N. (2022). *Microbial surfactants: A journey from fundamentals to recent advances*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 982603. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.982603>
- Parreira, A. G., Almeida, D., Bastos, C. G., Pires, M. E. E., Silva, J. A., Gonçalves, D. B., & Granjeiro, P. A. (2015). *Impacto dos ramnolipídeos na ruptura de biofilmes em peças de aço inox e titânio de uso ortopédico*. *Anais do Congresso Brasileiro de Bioquímica e Biologia Molecular*, 70. <https://doi.org/10.5151/biochem-jaibqi-0009>
- Pereira, A. G., Pacheco, G. J., Tavares, L. F., Neves, B. C., Kronemberger, F. D. A., Reis, R. S., & Freire, D. M. G. (2013). Optimization of biosurfactant production using waste from biodiesel industry in a new membrane assisted bioreactor. *Process Biochemistry*, 48(9), 1271–1278. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.028>
- Phulpoto, I. A., Wang, Y., Qazi, M. A., Hu, B., Ndayisenga, F., & Yu, Z. (2021). *Bioprospecting of rhamnolipids production and optimization by an oil-degrading Pseudomonas sp. S2WE isolated from freshwater lake*. *Bioresource Technology*, 323, 124601. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124601>
- Plaza, G., & Achal, V. (2020). *Biosurfactants: Eco-friendly and innovative biocides against biocorrosion*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 2152.
- Pradhan, A., & Bhattacharyya, A. (2017). *Utilization of biosurfactant for sustainable removal of oil and heavy metal contaminants from soil*. *Journal of Cleaner Production*, 150, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.013>
- Production of green surfactants: Market prospects. (2021). *Electronic Journal of Biotechnology*, 51, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.02.002>
- Retallack, D. M., Jin, H., & Chew, L. (2012). *Reliable protein production in a Pseudomonas fluorescens expression system*. *Protein Expression and Purification*, 81(2), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.09.010>
- Ribeiro, B. G., Guerra, J. M. C., & Sarubbo, L. A. (2020). *Potential food application of a biosurfactant produced by Saccharomyces cerevisiae URM 6670*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 434. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00434>
- Roberto de Oliveira, M., Novelli, A. P., Camilios-Neto, D., Fontes de Almeida, J. P., Pedrine, M. A., & Celligoi, C. (n.d.). *Produção de sofrolipídeos por Candida bombicola ATCC 22214: Padronização do inóculo na utilização de células imobilizadas em alginato de sódio*.
- S., Kesawat, M. S., Alavilli, H., Bhatia, S. K., Saratale, G. D., Saratale, R. G., Chung, S. M., & Kumar, M. (2021). Microbial biosurfactant: A new frontier for sustainable agriculture and pharmaceutical industries. *Antioxidants*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/antiox10091472>
- Saati-Santamaría, Z., Baroncelli, R., Rivas, R., & García-Fraile, P. (2022). Comparative Genomics of the Genus *Pseudomonas* Reveals Host- and Environment-Specific Evolution. *Microbiology Spectrum*, 10. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02370-22>
- Saien, J., Kharazi, M., Pino, V., & Pacheco-Fernández, I. (2023). *Trends offered by ionic liquid-based surfactants: Applications in stabilization, separation processes, and within the petroleum industry*. *Separation and Purification Reviews*, 52(3), 164–192. <https://doi.org/10.1080/15422119.2022.2052094>
- Saikia, R. R., Deka, S., Deka, M., & Banat, I. M. (2012). *Isolation of biosurfactant-producing Pseudomonas aeruginosa RS29 from oil-contaminated soil and evaluation of different nitrogen sources in biosurfactant production*. *Annals of Microbiology*, 62(2), 753–763. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0315-5>
- Saini, S. M., Sagar, T. K., Dwivedi, Y., & Chandrashekarappa, S. (2024). *Brief overview of surfactants, properties, classification, passivation, and role in chemistry*. In *Surfactant Based Electrochemical Sensors and Biosensors* (pp. 3–20). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15493-5.00018-X>

- Salager, J. L., & Fernández, A. (1993). *Surfactantes en solución acuosa*.
- Salek, K., Euston, S. R., & Janek, T. (2022). *Phase behaviour, functionality, and physicochemical characteristics of glycolipid surfactants of microbial origin*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 816613. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.816613>
- Salomon, G., & Giordano-Labadie, F. (2022). *Surfactant irritations and allergies*. *European Journal of Dermatology*, 32, 677–681. <https://doi.org/10.1684/ejd.2022.4290>
- Santos, A. S., Sampaio, A. P. W., Vasquez, G. S., Santa Anna, L. M., Pereira, N., & Freire, D. M. G. (2002). *Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology – Part A: Enzyme Engineering and Biotechnology*, 98–100, 1025–1035. <https://doi.org/10.1385/ABAB:98-100:1-9:1025>
- Sarkar, R., Pal, A., Rakshit, A., & Saha, B. (2021). *Properties and applications of amphoteric surfactant: A concise review*. *Journal of Surfactants and Detergents*, 24(5), 709–730. <https://doi.org/10.1002/jsde.12542>
- Saxena, N., Islam, M. M., Baliyan, S., & Sharma, D. (2023). *A comprehensive review on removal of environmental pollutants using a surfactant based remediation process*. *RSC Sustainability*, 1(9), 2148–2161. <https://doi.org/10.1039/D2SU00069E>
- Shaban, S. M., Kang, J., & Kim, D. H. (2020). *Surfactants: Recent advances and their applications*. *Composites Communications*, 22, 100537. <https://doi.org/10.1016/j.coco.2020.100537>
- Shu, Q., Lou, H., Wei, T., Liu, X., & Chen, Q. (2021). *Contributions of glycolipid biosurfactants and glycolipid-modified materials to antimicrobial strategy: A review*. *Pharmaceutics*, 13(2), 227.
- Silby, M., Winstanley, C., Godfrey, S., Levy, S., & Jackson, R. (2011). *Pseudomonas genomes: diverse and adaptable.. FEMS microbiology reviews*, 35 4, 652-80 . <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>.
- Singh, P., Patil, Y., & Rale, V. (2019). *Biosurfactant production: Emerging trends and promising strategies*. *Journal of Applied Microbiology*, 126(1), 2–13. <https://doi.org/10.1111/jam.14057>
- Soberón-Chávez, G., González-Valdez, A., Soto-Aceves, M. P., & Cocotl-Yañez, M. (2021). *Rhamnolipids produced by Pseudomonas: From molecular genetics to the market*. *Microbial Biotechnology*, 14(1), 136–146. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13700>
- Sun, S., Wang, Y., Zang, T., Wei, J., Wu, H., Wei, C., Qiu, G., & Li, F. (2019). *A biosurfactant-producing Pseudomonas aeruginosa S5 isolated from coking wastewater and its application for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons*. *Bioresource Technology*, 281, 421–428. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.087>
- Tadayon Tajabadi, M., Sabernejad, A., & Khalili Najafabadi, M. (2023). *Biosurfactant-producing microorganisms: Potential for bioremediation of organic and inorganic pollutants*. *Research in Biotechnology and Environmental Science*, 2(2), 18–23. <https://doi.org/10.58803/rbes.v2i2.13>
- Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2006). *Physiological aspects. Part I in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology*. *Biotechnology Advances*, 24(6), 604–620. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.08.001>
- Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2017). *Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant*. *Bioresource Technology*, 232, 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.047>
- Veeramanoharan, A., & Kim, S.-C. (2024). *A comprehensive review on sustainable surfactants from CNSL: Chemistry, key applications and research perspectives*. *RSC Advances*, 14(35), 25429–25471. <https://doi.org/10.1039/D4RA04684F>
- Vermelho, A. B., Pereira, A. F., Souto-Padrón, T. C. B., & Coelho, R. R. (2006). *Microscopia de microrganismos*. In *Práticas de Microbiologia* (1ª ed., pp. 79–128). Guanabara Koogan.

- Wang, T., Chang, D., Huang, D., Liu, Z., Wu, Y., Liu, H., Yuan, H., & Jiang, Y. (2021). *Application of surfactants in papermaking industry and future development trend of green surfactants*. Applied Microbiology and Biotechnology, 105(20), 7619–7634. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11602-6>
- Wang, Y., Sheng, H. F., He, Y., Wu, J. Y., Jiang, Y. X., Tam, N. F. Y., & Zhou, H. W. (2012). *Comparison of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments using millions of Illumina tags*. Applied and Environmental Microbiology, 78(23), 8264–8271. <https://doi.org/10.1128/AEM.01821-12>
- Wittgens, A., & Rosenau, F. (2018). *On the road towards tailor-made rhamnolipids: Current state and perspectives*. Applied Microbiology and Biotechnology, 102, 8175–8185.
- Wittgens, A., Santiago-Schuebel, B., Henkel, M., Tiso, T., Blank, L. M., Hausmann, R., Hofmann, D., Wilhelm, S., Jaeger, K. E., & Rosenau, F. (2018). *Heterologous production of long-chain rhamnolipids from Burkholderia glumae in Pseudomonas putida—A step forward to tailor-made rhamnolipids*. Applied Microbiology and Biotechnology, 102(3), 1229–1239. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8702-x>
- Xi, W., Ping, Y., & Alikhani, M. A. (2021). *A review on biosurfactant applications in the petroleum industry*. International Journal of Chemical Engineering, 2021, 5477185. <https://doi.org/10.1155/2021/5477185>
- Yilmaz, A. G. (2017). Development of a new *Pseudomonas* agar medium containing benzalkonium chloride in cetrimide agar. *Food and Nutrition Sciences*, 8(4), 367–378. <https://doi.org/10.4236/fns.2017.84025>
- Zanette, C. (2009). *Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: Uma nova aplicação metodológica no ensino de química*. Química Nova, 32(2).
- Zarei, O., Shokoohizadeh, L., Hossainpour, H., & Alikhani, M. Y. (2018). *Molecular analysis of Pseudomonas aeruginosa isolated from clinical, environmental and cockroach sources by ERIC-PCR*. BMC Research Notes, 11, 3765. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3765-z>

ANEXOS

Anexo I

Composição do meio de levedura marinha tamponada:

NaCl	24.0 g·L ⁻¹
Agar	20.0 g·L ⁻¹
Extrato de levedura.....	5.0 g·L ⁻¹
Tampão fosfato, pH 6.8	20.0 mL
Base mineral de Hutner	20.0 mL
KOH (1N)	7.0 mL
pH 6.8 ± 0.2 a 25°C	
Tampão fosfato pH 6,8, 1M(g·L ⁻¹):	
K ₂ H ₂ PO ₄	85.4g·L ⁻¹
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O.....	70.4g·L ⁻¹
Base mineral de Hutner (g·L ⁻¹):	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	29.7 g·L ⁻¹
Ácido nitriloacético	10.0 g·L ⁻¹
CaCl ₂ ·2H ₂ O.....	3.34 g·L ⁻¹
FeSO ₄ ·7H ₂ O.....	0.01 g·L ⁻¹
(NH ₄) ₂ MoO ₄	0,00925 g·L ⁻¹

Acetamida Cetrimida Glicerol Manitol Meio Seletivo:

Agar	15.0 g·L ⁻¹
K ₂ SO ₄	10.0 g·L ⁻¹
D-Mannitol	5.0 g·L ⁻¹
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.4 g·L ⁻¹
Cetrimida	0.3 g·L ⁻¹
Peptona	0.2 g·L ⁻¹

Solução de acetamida.....100.0mL

Glicerol.....5.0 mL

pH 7.0 ± 0.2 a 25°C

Solução de acetamida:

Acetamida..... $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

Vermelho de fenol..... $0,12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

Meio ACC:

Peptona proteose..... $20.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

Agar $12.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

Glicerol..... $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

K_2SO_4 $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$

$1.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Solução de antibiótico10.0 mL

pH 7.2 ± 0.2 a 25°C .

Solução de antibiótico (Composição por 10.0mL):

Cicloheximida..... $0.075\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Ampicilina..... $0.05\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Cloranfenicol..... $0.0125\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Anexo II

Meio Mínimo de Sais 1 composição por litro:

NaNO_3 $5.54\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

K_2HPO_4 $7\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

KH_2PO_4 $3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Glicerol.....30g·

L¹

Meio Mínimo de Sais 2, composição por litro:

NaHPO₄.....2.2g·L⁻¹

KH₂PO₄.....1.4g·L⁻¹

MgSO₄·7H₂O.....0.6g·L⁻¹

FeSO₄·7H₂O.....0.01g·L⁻¹

NaCl.....0.3g·L⁻¹

CaCl₂.....0.02g·L⁻¹

Glicerol.....20g·L⁻¹

Ureia.....1g·L⁻¹

Solução de oligoelementos..... 1g·L⁻¹

Solução de oligoelementos composição por litro:

ZnSO₄·7H₂O.....2.32g·L⁻¹

MnSO₄·4H₂O.....1.78g·L⁻¹

H₃BO₃.....0.56g·L⁻¹

CuSO₄·5H₂O.....1.0g·L⁻¹

NH₄MoO₄·2H₂O.....0.39g·L⁻¹

KI.....0.66g·L⁻¹

Meio Mínimo de Sais 3, composição por litro:

Glicerol bruto.....50g·L⁻¹

NaNO₃..... 4g·L⁻¹

K₂HPO₄.....7g·L⁻¹

KH₂PO₄.....3g·L⁻¹

MgSO₄·7H₂O.....0.2g·L⁻¹