

FÁBIO SÉRGIO PAULINO DA SILVA

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTE EM
SOLOS DA ILHA DA TRINDADE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586b
2012

Silva, Fábio Sérgio Paulino da, 1983-

Bioprospecção de bactérias produtoras de biossurfactante
em solos da Ilha da Trindade / Fábio Sérgio Paulino da Silva.
– Viçosa, MG, 2012.
ix, 44f. : il. ; 29cm.

Orientador: Marcos Rogério Tótola.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 40-44

1. Biossurfactantes. 2. *Bacillus subtilis*.
3. *Brevibacterium halotolerans*. 4. Microbiologia agrícola.
5. Trindade, Ilha da (ES). I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22. ed. 668.1

FÁBIO SÉRGIO PAULINO DA SILVA

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTE EM
SOLOS DA ILHA DA TRINDADE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de fevereiro de 2012.

Marcos Rogério Tótola
(Orientador)

Carlos Ernesto G. R. Schaefer
(Coorientador)

Antônio Galvão do Nascimento

Péricles Leonardo Fernandes

Aos meus pais e meus irmãos

A todos os amigos pela camaradagem

OBRIGADO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Marcos Rogério Tótola, meu orientador, por todo apoio neste projeto.

Aos professores Arnaldo Chaer Borges e Maria Catarina Megumi Kasuya, por todo auxílio.

À professora Elza Fernandes de Araújo, pelos aconselhamentos.

A todos os demais professores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos.

A todos os colegas do laboratório, pela ajuda e pela amizade.

Ao professor Carlos Ernesto G. R. Schaefer, pela parceria no projeto.

À Marinha do Brasil, pelo apoio logístico.

“... Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou televisão. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas próprias árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar do calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser; que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver”.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Surfactantes	3
2.2. Tipos e estruturas de biossurfactantes	5
2.3. Diversidade ambiental para bioprospecção.....	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Local e coleta das amostras	10
3.2. Isolamento e condições de cultivo para bioprospecção de bactérias com capacidade de produção de biossurfactantes em diferentes concentrações de NaCl	11
3.3. Avaliação da produção de biossurfactantes: método do espalhamento de óleo	11
3.4. Purificação de biossurfactantes	13
3.5. Tensões interfaciais hexadecano-água	13
3.6. Tensões Superficiais	13
3.7. Identificação dos isolados bacterianos	14
3.7.1 Análise do perfil de ácidos graxos	14
3.7.2 Extração de DNA, amplificação, sequenciamento e análise de sequencias do rDNA 16S	14
3.8. Preservação das linhagens bacterianas.....	16
4. RESULTADOS	17
4.1. Isolamento das bactérias produtoras de biossurfactantes.....	17
4.2. Efeito da concentração de NaCl sobre a tensão interfacial	20
4.3. Efeito da concentração de NaCl sobre a tensão superficial.....	23
4.4. Identificação dos isolados	25
6. DISCUSSÃO	32
5. CONCLUSÕES.....	40
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do meio mineral ME.

Tabela 2. Características do solo e resultado de triagem de bactérias produtoras de biossurfactantes.

Tabela 3. Concentração de biossurfactantes produzidos por isolados selecionados, e cultivados em meio ME Salino por 7 dias a 30 °C e 200 rpm.

Tabela 4. Valores de Tensão Superficial em relação a diferentes concentrações salinas, dos isolados produtores de biossurfactantes.

Tabela 5. Identificação dos isolados pelo perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos.

Tabela 6. Comparações entre as sequências de rDNA 16S dos isolados de bactérias produtoras de biossurfactantes e as depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa mostrando os locais dos 12 pontos de coletas.

Figura 2. Diâmetro do halo de espalhamento de óleo em função da concentração de surfactina comercial (Sigma) (Fernandes, 2011).

Figura 3. Efeito da concentração de NaCl na tensão interfacial dos extratos de biossurfactantes purificados. As mensurações foram feitas utilizando hexadecano como fase leve.

Figura 4. Valores de Tensão Superficial em função da concentração salina dos isolados TR 13, e TR 14. Erro padrão inferior a 0,05.

Figura 5. Dendrograma construído com base na Distância Euclidiana dos perfis de ácidos graxos dos isolados da Ilha da Trindade, analisados pelo método ITSA 1.00 (MIDI).

Figura 6. Dendrograma construído com base na distância euclidiana dos isolados a partir da análise da composição de ácidos graxos. Biblioteca do método IR2A 1 1.00.

RESUMO

SILVA, Fábio Sérgio Paulino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Bioprospecção de bactérias produtoras de biossurfactante em solos da Ilha da Trindade.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Coorientadores: Arnaldo Chaer Borges e Carlos Ernesto G. R. Schaefer.

Biossurfactantes - ou surfactantes microbianos - são moléculas com propriedades tensoativas produzidas por uma grande diversidade de micro-organismos, presentes em diversos habitats. Os biossurfactantes compõem uma classe de compostos que têm mostrado potencial de aplicação em diversas áreas industriais economicamente importantes. Nas aplicações relacionadas à cadeia do petróleo, a exemplo da recuperação avançada de petróleo, biorremediação de ambientes marinhos contaminados com óleo e tratamento de água de produção, é necessário que os biossurfactantes mantenham sua atividade em condições extremas, especialmente sob elevadas salinidade e temperatura. Nesse contexto, os biossurfactantes são os melhores substitutos de seus homólogos sintéticos, dada a sua tolerância a condições extremas. O objetivo deste estudo foi prospectar isolados produtores de biossurfactantes ativos em concentrações salinas elevadas. Amostras de solos, sem histórico de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo, foram coletadas na ilha da Trindade, local de difícil acesso e com atividade antrópica reduzida ou inexistente. Das 12 amostras de solos coletadas, foram selecionados 14 isolados. Avaliaram-se a produção de biossurfactantes, a tensão interfacial (hexadecano) e superficial. Os isolados foram identificados por meio de perfil de ácidos graxos e sequenciamento da região rRNA 16S. Dentre os biossurfactantes obtidos, destacou-se o produzido por *Brevibacterium halotolerans*, o qual manteve sua atividade em solução contendo até 175 g.L^{-1} de NaCl. Esse é o primeiro relato de produção de um biossurfactante por essa espécie. Sua elevada tolerância à salinidade coloca o isolado como promissor para aplicações biotecnológicas na cadeia do petróleo.

ABSTRACT

SILVA, Fábio Sérgio Paulino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Bioprospecting of biosurfactant producing bacteria in Trindade Island soils.** Advisor: Marcos Rogério Tótola. Co-advisors: Arnaldo Chaer Borges and Carlos Ernesto G. R. Schaefer.

Biosurfactants or microbial surfactants are biomolecules with tension active properties produced by a wide variety of microorganisms in various habitats, being a unique class of compounds which has shown potential application in various industrial fields economically important. In applications related to oil chain, such as the enhanced oil recovery, bioremediation of marine oil-contaminated water treatment and production, it is necessary for maintaining its activity biosurfactants in extreme conditions, especially under high salinity and temperature. Biosurfactants are the best substitutes for their synthetic counter parts due to higher activity in extreme conditions, lower toxicity and better biodegradability. The objective of this study was to explore isolated producers of active biosurfactant in high salt concentrations, for application related to petroleum activities that require these features. In the present study were collected soil samples from a completely isolated region located at Trindade island, being a place of difficult access and little or no human activity. From 12 soil samples collected 14 isolates were selected, that had the biosurfactants production quantified, the surface and interfacial tension activity measured and subsequently identified to species by the fatty acid profile and 16S rRNA region sequencing. Among the biosurfactants obtained, it was stood out produced by *Brevibacterium halotolerans*, which maintained its activity in a solution containing 175 g. L⁻¹ NaCl. This is the first report of biosurfactant production by this species. Its high salt tolerance isolated places as promising for biotechnological applications in the oil chain.

1. INTRODUÇÃO

Surfactantes são moléculas anfipáticas contendo uma cabeça hidrofílica e uma cauda apolar de hidrocarbonetos. Esses compostos reduzem a tensão superficial e interfacial na interface entre fluidos imiscíveis, resultando em propriedades como detergência, emulsificação, formação de espuma, solubilização e mobilização de compostos orgânicos hidrofóbicos (Abbasi *et al.* 2011).

O aumento da consciência ambiental, tanto por parte da sociedade civil quanto do setor produtivo, tem levado a um maior interesse pelos surfactantes microbianos (biossurfactantes), em contra-posição a seus homólogos químicos, em razão de propriedades únicas de biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior seletividade e aceitabilidade ambiental. Além disso, os biossurfactantes apresentam menor concentração micelar crítica e capacidade de manter suas atividades em condições extremas de temperatura, de pH e de salinidade (Morita *et al.* 2007).

Biossurfactantes têm uma ampla gama de aplicações em diversos processos agrícolas e industriais, incluindo os das indústrias de petróleo e gás natural, farmacêuticas, alimentícias e nas de cosméticos (Singh *et al.* 2007).

Especificamente na indústria petrolífera, os biossurfactantes podem ser empregados em processos de recuperação avançada de petróleo, remediação de ambientes contaminados com óleo e derivados, limpeza de tanques de armazenamento de óleo e no tratamento de água de produção. Essas aplicações requerem que as moléculas mantenham-se funcionais em soluções com alta salinidade, condição que, normalmente, inativa a maioria dos surfactantes sintéticos.

Somente um pequeno número de bactérias foram descritas como capazes de crescer e de produzir biossurfactantes ativos em condições extremas (Shavandi *et al.* 2011).

A maioria dos trabalhos de bioprospecção de micro-organismos produtores de biossurfactantes para aplicação na cadeia produtiva do petróleo é geralmente realizada em ambientes marinhos ou terrestres contaminados com óleo. Tem-se como princípio que a produção de compostos com ação de solubilidade dos substratos hidrocarbônicos hidrofóbicos favorece as populações produtoras, sendo essa, pois, uma pressão seletiva que tende a enriquecer esse grupo de populações em ambientes impactados pela presença de hidrocarbonetos. É relevante se

considerar, porém, que muitos hidrocarbonetos apresentam alta toxicidade para todos os grupos de organismos (Das e Mukherjee, 2007). Portanto, a presença de hidrocarbonetos no ambiente pode alterar a riqueza e a abundância de espécies da comunidade que ali se estabelece, contribuindo para redução de vias metabólicas complexas que possam produzir moléculas de interesse para diferentes aplicações, inclusive as relacionadas com a indústria do petróleo.

Considerando-se ainda que os biossurfactantes estão envolvidos em outros processos ecológicos importantes para a célula, estas moléculas são uma importante estratégia de sobrevivência e crescimento microbiano nos mais diversos ambientes, sendo necessária em processos metabólicos vitais para a célula (Bodour *et al.* 2003). Além disso, estão relacionadas ao aumento da disponibilidade de substratos hidrofóbicos que não são, necessariamente, derivados do petróleo, sendo factível supor a ocorrência de populações microbianas produtoras de biossurfactantes em ambientes prístinos.

Este trabalho teve como foco o isolamento de bactérias produtoras de biossurfactantes ativos em alta concentração salina, a partir de amostras de solo sem histórico de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo ou de outros impactos antrópicos. As amostras foram coletadas na ilha oceânica da Trindade, localizada a 1.140 km a oeste da costa brasileira, entre os paralelos 20° 30' S e 29° 18'. A ilha apresenta dificuldade de desembarque e possui acesso exclusivamente por mar, não oferecendo condições para o turismo. Característica singular de Trindade condiz a sua matriz rochosa que pertence a uma série vulcânica oceânica mais subsaturadas em sílica e mais sódico-alcalinas do Atlântico, constituindo uma das séries oceânicas mais sódicas senão a mais sódica já registrada (Almeida, 1992). Caracteriza-se, assim, como sendo um local excepcional para investigações científicas, em razão do extremo isolamento geográfico e da ausência de efeitos antrópicos na maior parte de seu território (Clemente *et al.* 2009).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Surfactantes

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais. A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente são sintetizados a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações ambientais, levaram à procura por surfactantes naturais como alternativas aos produtos existentes (Banat *et al.* 2000). Surfactante é uma palavra derivada da contração da expressão “*surface active agent*”, termo que significa, literalmente, agente de atividade superficial. Outro termo que designa o mesmo tipo de substância é tensoativo. O surfactante (ou tensoativo) é um composto caracterizado pela capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido. O termo interface denota o limite entre duas fases imiscíveis, enquanto o termo superfície indica que uma das fases é gasosa. Outra propriedade fundamental dos surfactantes é a tendência de formar agregados chamados micelas que, geralmente, formam-se a baixas concentrações em água. A concentração mínima na qual inicia-se a formação de micelas chama-se concentração micelar crítica (CMC), sendo essa uma importante característica de um surfactante. Essas propriedades tornam os surfactantes adequados para uma ampla gama de aplicações industriais, envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (Guyton e Hall 2002).

A maior utilização dos surfactantes se concentra na indústria de produtos de limpeza (sabões e detergentes), na indústria de petróleo e na indústria de cosméticos e produtos de higiene. A produção mundial de surfactantes excede três milhões de toneladas por ano. Atualmente, nos países industrializados, 70-75% dos surfactantes consumidos são de origem petroquímica, enquanto que nos países em desenvolvimento, os compostos de origem natural predominam. Entretanto, nos países industrializados existe uma tendência para a substituição dos surfactantes sintéticos pelos naturais. Essa tendência é movida pela necessidade de produtos

mais brandos, pela necessidade de substituição de compostos não-biodegradáveis e pelo aumento da especificidade dos produtos (Bongolo 1999).

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, que diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (Cameotra e Makka, 1998). Assim como os surfactantes sintéticos, os biossurfactantes são moléculas anfipáticas constituídas por uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica, o que permite sua distribuição em interfaces com diferentes graus de polaridade (Nitschke e Pastore, 2002). Seus grupamentos hidrofílicos e hidrofóbicos respondem por suas propriedades de adsorção, formação de micelas, formação de macro e micro-emulsões, lubrificação, ação espumante, capacidade molhante, solubilização e detergência (Cristofi e Ivshina, 2002). Propriedades características dos surfactantes, como tensão superficial e interfacial, capacidade de estabilização de emulsões e balanço lipofílico-hidrofílico (HLB), são adotadas para sua qualificação em termos de atividade (Maneerat, 2005). Sua capacidade de formar emulsões e de solubilizar compostos hidrofóbicos pode ser útil, por exemplo, para aumentar a biodisponibilidade de compostos orgânicos em processos de biorremediação (Muthusamy et al., 2008; Nitschke e Pastore, 2002). Os biossurfactantes apresentam ainda a propriedade de aumentarem a estabilidade de emulsões, já que reduzem a tensão interfacial, diminuindo assim a energia na superfície entre duas fases (Bezerra, 2006; Mulligan, 2005). A atividade de alguns biossurfactantes permanece estável em condições físico-químicas variadas e adversas, a exemplo de condições extremas de temperatura, salinidade, pressão e de pH (Nitschke e Pastore, 2006; Bognolo, 1999).

Apesar de apresentarem características fundamentalmente comuns aos surfactantes sintéticos, os surfactantes de origem microbiana exibem propriedades peculiares que os tornam bastante atrativos e comparativamente mais vantajosos, principalmente quando se trata da aplicação em processos relacionados à indústria petrolífera. Dentre essas propriedades, merece destaque sua efetividade na recuperação de petróleo e possibilidade de produção a partir de substratos renováveis e de baixo custo (Lima *et al.* 2011a).

A grande diversidade existente entre micro-organismos produtores de biossurfactantes sugere que essas moléculas são uma importante estratégia de sobrevivência e de crescimento microbiano nos mais diversos ambientes (Bodour *et al.* 2003). Vários eventos que interferem direta ou indiretamente com o crescimento ou com a fisiologia geral dos micro-organismos são atribuídos à ação de surfactantes por eles produzidos, como aumento da biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos, complexação de metais pesados, patogenicidade, motilidade, regulação da adesão ou desorção de células, emulsificação, quorum-sensing, interferência na formação, maturação ou desagregação de biofilmes, facilitação do transporte microbiano em meios porosos, dentre outros (Ron e Rosenberg, 2002). Os biossurfactantes exibem ainda propriedades antibióticas, anticoagulantes, hemolíticas e antivirais (Carrillo *et al.*, 2003).

2.2. Tipos e estruturas de biossurfactantes

Os biossurfactantes apresentam ampla diversidade estrutural e funcional, o que propicia flexibilidade na sua aplicação (Banat, 1995; Banat *et al.*, 2000; McInerney *et al.*, 2004). Podem apresentar carga em seu grupamento hidrofílico, sendo também classificados como catiônicos, aniônicos, não-iônicos e zwitteriônicos (anfotéricos) (Christofi e Ivshina, 2002). São classificados como glicolipídios, fosfolipídios, ácidos graxos, lipídios neutros, lipopolissacarídeos, lipopeptídios, lipoproteínas e surfactantes particulados, sendo os lipopeptídeos os mais efetivos (Mulligan e Gibbs, 2004).

Os biossurfactantes da classe dos glicolipídios têm na sua constituição moléculas de carboidratos (glicose, manose, galactose, ou ramnose) em combinação com ácidos alifáticos de cadeias longas (Holmberg, 2001). Entre os glicolipídios, os mais conhecidos são os ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (Benincasa *et al.* 2004), os trealolipídios produzidos por *Rhodococcus erythropolis* (Uchida *et al.* 1989) e os soforolipídios produzidos por *Candida bombicola* ou *Candida apicola* (Hommel *et al.* 1994).

Fosfolipídios e ácidos graxos surfactantes são produzidos por uma grande variedade de bactérias e leveduras, quando esses micro-organismos utilizam alcanos como fonte de carbono e de energia (Cirigliano e Garman, 1985). O balanço

hidrofílico-lipofílico (HLB) desses biossurfactantes é diretamente relacionado ao comprimento da cadeia hidrocarbônica em suas estruturas. Fosfatidiletanolamina, produzida por *Rhodococcus erythropolis* durante o crescimento em meio de cultura contendo alcano como fonte de carbono e energia, foi reportada como capaz de reduzir a tensão interfacial entre água e hexadecano (Kretschmer *et al.*, 1982). *Corynebacterium lepus* e *Arthrobacter parafineus* foram descritas como produtoras de ácidos graxos com propriedades tensoativas (Makkar e Cameotra 2002).

Lipídios neutros compreendem os ácidos graxos, triacilgliceróis e ácidos micólicos. Possuem misturas de ácidos graxos α e β -hidroxilados. A maioria dos lipídios neutros, como os triacilgliceróis e seus ácidos graxos constituintes, mostram algum grau de atividade tensoativa. Assim como os ácidos micólicos, eles constituem ácidos graxos mais complexos. Esses compostos, por sua vez, são sintetizados por espécies de *Mycobacterium spp.* e por alguns espécies dos gêneros *Nocardia*, *Corynebacterium* e *Rhodococcus*. (Cooper e Zajic, 1980).

Lipopolissacarídeos são ácidos graxos ligados covalentemente a polissacarídeos. Os lipopolissacarídeos mais bem estudados são o Emulsan, Liposan e Manoproteína. Emulsan, produzido por *A. calcoaceticus* RAG-1, foi o primeiro surfactante microbiano a ser produzido e comercializado em larga escala (Rosenberg e Ron, 1999). É caracterizado como um heteropolissacarídeo polianiônico (Ferrarezzo, 1998). Liposan é um tensoativo extracelular sintetizado por *Candida lipolytica*, sendo composto de 83% de carboidrato e 17% de proteínas (Cirigliano e Garman, 1985). Manoproteína é uma proteína produzida por *Saccharomyces cerevisiae*, através de processo biotecnológico simples, de larga escala e baixo custo (Barros *et al.*, 2007).

Lipopeptídeos são surfactantes caracterizados pela presença de uma porção lipídica e outra protéica na molécula. Diversas espécies de *Bacillus* são comumente encontradas em reservatórios de petróleo e grande parte delas apresenta capacidade de produção de lipopeptídeos. Dentre os lipopeptídeos destaca-se a surfactina, um dos surfactantes mais efetivos e estudados, produzida por isolados de *Bacillus subtilis* (McInerney *et al.*, 2004).

As células microbianas e vesículas extracelulares com atividades tensoativas são classificadas como biossurfactantes particulados. Algumas células microbianas apresentam evada hidrofobicidade superficial, sendo consideradas por si só como

biossurfactantes, a exemplo de algumas espécies de cianobactérias e alguns patógenos, como *Staphylococcus aureus* e *Serratia sp.* Bactérias do gênero *Acinetobacter sp.*, quando crescem em meio contendo hexadecano, produzem vesículas extracelulares que têm função importante na captação de alcanos para a célula, possuindo elevada atividade surfactante (Gautam e Tayagi, 1979).

2.3. Diversidade ambiental para bioprospecção

Vários seres vivos, além de bactérias e leveduras, produzem biossurfactantes, incluindo os animais, as plantas e outros grupos de micro-organismos. Porém, em decorrência do curto tempo de geração dos micro-organismos, comparativamente ao crescimento de animais e de plantas, a produção de biossurfactantes por micro-organismos é considerada como a forma mais promissora de se produzir esses compostos (Lang, 2002).

Micro-organismos produtores de biossurfactantes têm sido isolados de vários ambientes, como solo, água do mar, sedimentos marinhos, entre outros. A presença de micro-organismos produtores de biossurfactantes é usual em solos contaminados, como demonstrado em grande parte dos estudos relacionados à bioprospecção desses micro-organismos. Citam-se como exemplos o isolado produtor de moléculas tensoativas identificado como *Rhodococcus sp.* strain TA6, isolado de solos contaminados com petróleo de refinarias iranianas (Shavandi *et al.* 2011); a bactéria termofílica *Alcaligenes faecalis*, isolada de solos contendo contaminantes derivados de petróleo localizados na Índia. A molécula bioativa foi identificada como uma nova classe de glicolípido, com potencial utilização biotecnológica e na indústria petrolífera (Bharali *et al.*, 2011); a bactéria isolada de solos contaminado com gasolina, identificada como *P. aeruginosa* e designada WH-2, capaz de produzir compostos surfactantes com potencial aplicação para biorremediação (Sharma *et al.* 2009); o glicolípido produzido pelo isolado *Brevibacterium sp.* a partir de solos contaminados com hidrocarbonetos no sudeste da Argélia, com potencial para aplicação na indústria farmacêutica (Ferhat *et al.* 2011). Menciona-se ainda o micro-organismo *Bacillus circulans*, isolado de solos contaminados com metais pesados nas ilhas Andamam e Nicobar, localizadas na Índia (Das *et al.*, 2007). Estudo realizado por Boudour e colaboradores (2003)

demonstrou que pelo menos um microrganismo produtor foi encontrado em 20 dos 21 tipos de solo estudados, entre os quais encontravam-se solos contaminados com hidrocarbonetos, com metais pesados ou com metais e hidrocarbonetos.

Alguns trabalhos de bioprospecção já foram realizados a partir de resíduos de indústrias alimentícias de carne, processamento de óleo de cozinha, refrigerantes e alimentos enlatados (Abbasi *et al.* 2011). Biossurfactantes produzidos por *Lactobacillus paracasei* isolados de resíduos de uma indústria leiteira localizada em Portugal, foram caracterizados como moléculas propícias ao emprego farmacêutico (Gudiña *et al.*, 2010).

Apesar dos relatos de isolamento de micro-organismos produtores de biossurfactantes em ambientes prístinos, a maioria dos trabalhos de bioprospecção desses micro-organismos é conduzida com amostras de ambientes sujeitos à ação antrópica. Poucos trabalhos reportam a bioprospecção de micro-organismos produtores de moléculas surfactantes em locais sem histórico de contaminação ou de outras ações antrópicas. Citam-se entre esses o isolamento de bactérias produtoras de biossurfactantes em solos sem contaminação de qualquer fonte de poluentes (Bodour *et al.*, 2003). O isolado identificado como *Brevibacterium aureum*, designado MSA 13, foi obtido de esponjas marinhas (*Dendrilla nigra*), coletadas no mar do sudoeste da costa da Índia em profundidades rasas (10-15m). O biossurfactante produzido por esse micro-organismo demonstrou potencial aplicação em processos de recuperação de petróleo em ambientes marinhos (Kiran *et al.*, 2010).

O interesse na produção de surfactantes microbianos tem levado ao desenvolvimento de métodos quantitativos e qualitativos rápidos e eficientes para seleção e análise de organismos produtores de biossurfactantes (Banat *et al.*, 2000). Dentre esses métodos, destacam-se o protocolo simplificado sugerido por Youssef e colaboradores (2004), utilizado para rastrear e quantificar a produção de biossurfactantes. Primeiro são selecionadas as culturas positivas para formação de halo (hemólise por ação de moléculas tensoativas) em ágar-sangue. Posteriormente, as colônias obtidas como positivas para hemólise são submetidas ao teste de colapso da gota ou à técnica de espalhamento de óleo, para confirmação e quantificação dos biossurfactantes produzidos. Mensurações da tensão superficial podem ser utilizadas para se confirmar os resultados.

Neste trabalho, são reportados os resultados de bioprospecção de bactérias produtoras de biossurfactantes em solos da Ilha da Trindade. A ilha apresenta superfície de 13 km², e situa-se no oceano Atlântico sul, aproximadamente no paralelo da cidade de Vitória, Estado do Espírito Santo, afastada 1.140 km da linha de costa. Caracteriza-se por apresentar relevo íngreme associado a uma zona de fratura transversal de montes vulcânicos submarinos (Barros, 1959). A parte emersa da ilha repousa sobre o assoalho oceânico a quase 5.500 m de profundidade (Castro & Antonello, 2006), sendo que os pontos mais altos apresentam altitudes próximas a 600 m.

Atualmente, a ilha é referida como o único local em território brasileiro em que ainda se pode reconhecer parte de um cone vulcânico (Almeida, 1961). A diversidade de solos é profundamente relacionada com as variações do material de origem vulcânica e posição altimétrica (Ramos, 1950). De maneira geral, os solos apresentam alta fertilidade natural e grau de intemperismo pouco acentuado (Castro & Antonello, 2006). O clima é do tipo oceânico tropical, com temperatura média anual de 25 °C, sendo o mês de fevereiro o mais quente (30 °C) e o de agosto o mais frio (17 °C) (Soares, 1964).

A vegetação das regiões baixas e superfícies do vulcanismo ankarastrítico, assim como das áreas de piroclastos do platô axial é baixa, do tipo campestre, com ervas, gramíneas e ciperáceas. Já no platô axial, nas vertentes dos morros fonolíticos, podem ser encontradas vegetações arbóreas, destacando-se as comunidades de samambaias gigantes (*Cyathea trinidadensis*), com até 6 m de altura (Soares, 1964).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local e coleta das amostras

A coleta das amostras de solo foi realizada com apoio logístico da Marinha do Brasil, como parte do programa de pesquisa PROTRINDADE/CNPq. Foram realizadas duas expedições à Ilha da Trindade, sendo a primeira no período de 22 a 31 de Março de 2011 e a segunda de 26 de Abril a 07 de Maio de 2011. Foram escolhidos doze pontos amostrais, cada um representativo de um tipo de solo presente na ilha, sendo as amostras coletadas em triplicata (Figura 1). Para cada triplicata, foram realizadas 15 prospecções a uma profundidade de 10 cm, com distância de 1,5 m entre elas e de 10 m entre cada triplicata.

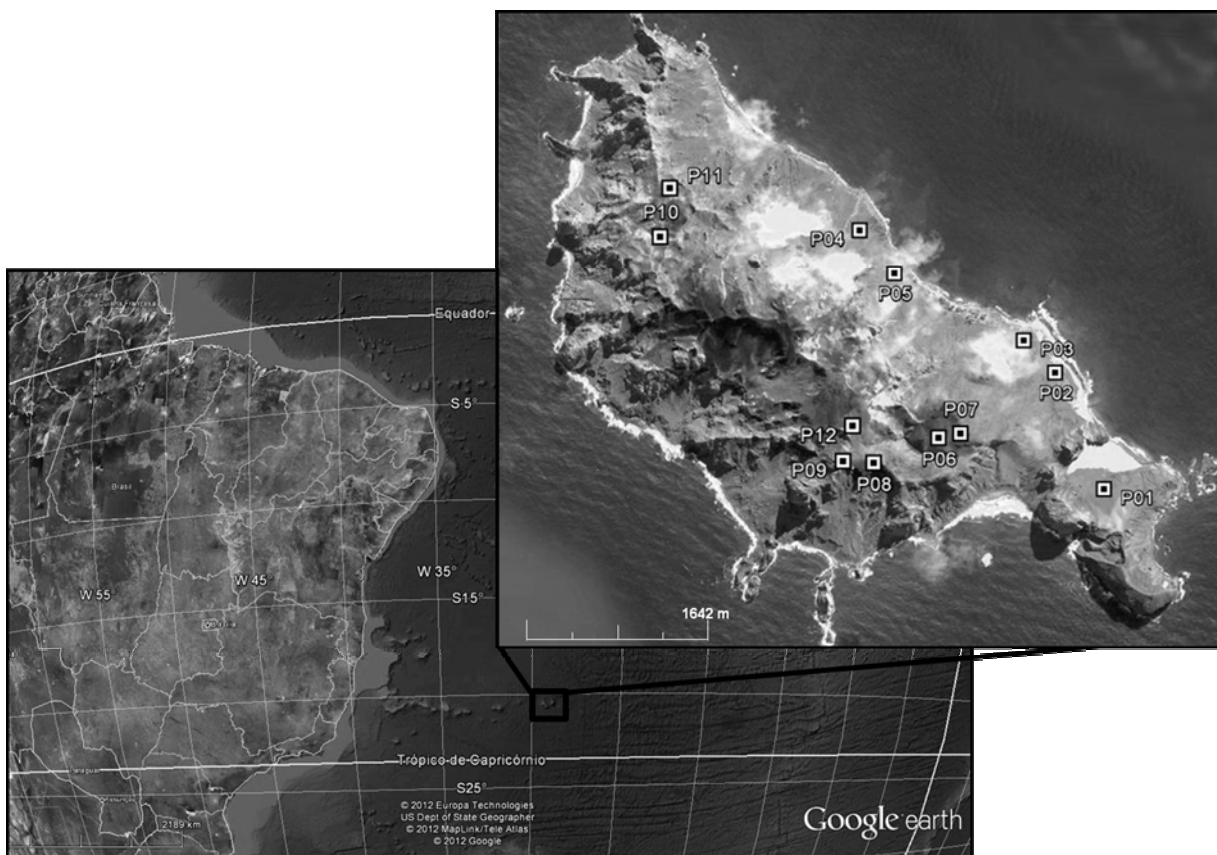


Figura 1 – Mapa mostrando os locais dos 12 pontos de coletas.

As coletas foram feitas com tubos de aço inoxidável com diâmetro de 1,5 cm, limpos em campo com álcool a 70 % antes de cada perfuração. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos e mantidas a 4 °C até o processamento.

3.2. Isolamento e condições de cultivo para bioprospecção de bactérias com capacidade de produção de biossurfactantes em diferentes concentrações de NaCl

10 g de cada amostra de solo foram colocadas em frascos Erlenmeyer contendo 10 g de pedriscos e 95 mL de solução tampão com pirofosfato de sódio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) a 1 g.L^{-1} . Os frascos foram agitados durante 20 minutos a 27 °C e 200 rpm. A suspensão foi submetida à diluição seriada e posterior plaqueamento em meio ágar-sangue, contendo 30 g.L^{-1} de TSA (*trypticase soy agar*), 50 g.L^{-1} de NaCl e 5% (v/v) de sangue de carneiro desfibrinado. Após incubação por 48 h a 37 °C, a presença de halos ao redor das colônias (beta hemólise) (Youssef *et al.* 2004) foi utilizada como indício da presença de biossurfactantes.

As colônias classificadas como positivas para formação de halos foram novamente plaqueadas no mesmo meio de cultivo (TSA), para obtenção de culturas puras.

3.3. Avaliação da produção de biossurfactantes: método do espalhamento de óleo

A determinação da concentração de biossurfactante produzido e a detecção de possíveis falsos-positivos (culturas oriundas de colônias com halo, mas que não produzem biossurfactantes), foram realizadas utilizando-se o teste confirmativo de espalhamento de óleo (Youssef *et al.* 2004).

Após obtenção das culturas puras, os isolados foram cultivados por 48 horas em tubos contendo 10 mL de caldo TSA a 30 °C e 200 rpm. As culturas foram centrifugadas ($10.000 \times g$, 25 °C, 15 min) para se obter o extrato livre de células. Uma placa de Petri (150 x 20 mm) foi preenchida com 100 mL de água deionizada. Uma alíquota de 30 μL de petróleo cru foi depositada na superfície da água de modo a se formar um filme de petróleo. 10 μL do sobrenadante da cultura sem

células foram cuidadosamente depositados no centro da placa e sobre o filme de óleo. A quantificação da atividade relativa de biosurfactante se deu mediante a mensuração do diâmetro do halo formado no filme de óleo e comparação com uma curva de calibração construída com a utilização de surfactina comercial (Fernandes, 2011). Os isolados cujos extratos formaram halos superiores a 0,5 cm de diâmetro foram cultivados (6 dias, 30 °C, 200 rpm em frascos Erlenmeyer de 125 mL) em 50 mL de meio mineral – ME (Tabela 1), contendo glicose como fonte de carbono (20 g.L⁻¹) e NaCl a 50 g.L⁻¹.

Tabela 1. Composição do meio mineral ME.

Componentes	Concentração (g L⁻¹)
K ₂ HPO ₄	13,9
KH ₂ PO ₄	2,70
Extrato de levedura	1,00
NH ₄ NO ₃	1,00
NaCl	49,0
Solução de Metais e micronutrientes	Concentração (50 mL L⁻¹)
EDTA	0,50
Mg SO ₄ . 7 H ₂ O	3,0
Mn SO ₄ . H ₂ O	0,50
NaCl	1,0
Ca Cl ₂ . 2 H ₂ O	0,10
Zn SO ₄ . 7 H ₂ O	0,10
Fe SO ₄ . 7 H ₂ O	0,10
Cu SO ₄ . 5 H ₂ O	0,010
Na Mo O ₄ . 2 H ₂ O	0,010
Na Sc O ₄	0,010
Na Wo O ₄ . 2 H ₂ O	0,010
Ni Cl ₂ . 6 H ₂ O	0,020

FONTE: Fonte: Reasoner e Geldreich (1985).

3.4. Purificação de biossurfactantes

Os biossurfactantes produzidos em meio mineral (item 3.3) foram parcialmente purificados, empregando-se o método da precipitação ácida (Vater *et al.* 2002). As amostras (30 mL em tubos Falcon de 50 mL) foram centrifugadas (12.000 x g, 20 minutos, 20°C) para sedimentação celular. Em seguida, o pH foi ajustado com HCL a 6 mol.L⁻¹ para 2,0 (dois), seguindo-se repouso em geladeira por 4 °C por 12 h (*overnight*). As amostras foram centrifugadas novamente a 9.000 x g, o sobrenadante foi descartado e os biossurfactantes foram ressuspensos em água deionizada em igual volume para quantificação.

3.5. Tensões interfaciais hexadecano-água

As tensões interfaciais entre o petróleo e as soluções dos biossurfactantes purificados foram avaliadas em um tensiômetro *Spinning drop* Krüss, modelo Site100HS, empregando-se as soluções surfactantes sob teste como fase contínua e 10 µL de hexadecano como fase leve. As leituras foram feitas em rotação de 4.000 rpm e temperatura de 35 °C. As tensões interfaciais entre o petróleo e as amostras foram mensuradas após 20 minutos, sendo a tensão interfacial real aquela obtida após alcançar-se a estabilidade dos valores mensurados (Krüss®, Alemanha).

O efeito da salinidade da solução surfactante sobre a tensão interfacial foi avaliado por meio da adição de NaCl à solução surfactante, de modo a se obterem as concentrações de 0, 25, 50, 100, 150 e 175 g.L⁻¹.

3.6. Tensões Superficiais

As tensões superficiais (TS) das soluções de biossurfactantes purificados foram avaliadas em tensiômetro *Dataphysics* DCAT 21, com o auxílio do programa SCAT versão 3.2.0.84, utilizando-se o método da placa de *Wilhelmy* e o valor de 0,05 como valor-limite do desvio padrão. O efeito da salinidade sobre a tensão superficial foi avaliado por meio da adição de NaCl às soluções de biossurfactante,

de modo a se obterem as concentrações de 0, 25, 50, 100, 150 e 175 g.L⁻¹ (Fernandes, 2011).

3.7. Identificação dos isolados bacterianos

3.7.1 Análise do perfil de ácidos graxos

Os isolados de interesse (produtores de biossurfactantes), foram identificados por meio da análise de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (FAME) e do seqüenciamento e análise da seqüência parcial do rDNA 16 S.

Os isolados foram cultivados em ágar TSA a 30 °C por 24 horas. Colônias isoladas do terceiro quadrante foram utilizadas para obtenção dos FAME, utilizando-se o kit *Instant Fame* (MIDI Inc., Newark, DE), de acordo com as recomendações do fabricante. O extrato foi analisado em um cromatógrafo a gás Agilent 7890. O programa MIDI Sherlock[®] (*Sherlock Microbial Identification System* de MIDI Inc. Newark, Delaware, USA) foi utilizado para ajustar os parâmetros operacionais do cromatógrafo gasoso e para o reconhecimento, quantificação dos picos obtidos nos cromatogramas e comparação com a biblioteca de referência ITSA 1.0 e IR2A 1.0. As identificações foram realizadas com base nos índices de similaridade (IS), sendo o isolado considerado como desconhecido quando o IS foi inferior a 0,3; como identidade em nível de gênero quando maior que 0,3; e considerado como identificado em nível de espécie, quando maior que 0,5 (Buyer, 2003). As identificações bacterianas foram expressas como gênero-espécie-sub-espécie (Kunitsky *et al.* 2006).

3.7.2 Extração de DNA, amplificação, sequenciamento e análise de sequencias do rDNA 16S

A identificação dos isolados foi confirmada por seqüenciamento e análise da seqüência parcial do rDNA 16 S. Os isolados foram reativados em ágar BD (Bacto™

– Tryptic Soy Broth) a 30 °C por 24 h. Uma colônia foi inoculada em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo BD, seguindo-se incubação por 24 h a 30 °C e 150 rpm.

A extração do DNA total das culturas foi realizada por protocolo simplificado de extração de DNA baseado em lise térmica (Moore *et al.*, 2004), adaptado por Boniek *et al.* 2010.

A amplificação do fragmento parcial do rDNA 16S foi realizada utilizando-se *primers* universais para *Bacteria* 5F (5' – TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCA – 3') e 531 r (5' TACCGCGGCTGCTGGCAC- 3') (Hall *et al.* 2003). As misturas das reações em volume final de 25 µL continham aproximadamente 20 ng de DNA molde, tampão da Taq (PROMEGA™, Madison, EUA) sem corante, 2,25 mM de MgCl₂, 210 nM de cada primer, 250 µM de desoxinucleotídeos (dNTP's) e 0,02 U de Taq DNA polimerase (PROMEGA™, Madison, EUA).

A reação de amplificação foi efetuada em termociclador (*Master Gradient, Eppendorf-Germany*), programado para realizar a desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 1 minuto, extensão por 1 minuto e 30 segundos a 72 °C e extensão final durante 7 minutos a 72 °C. Os produtos resultantes da reação de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose (12 g.L⁻¹), em tampão TAE 0,5 X. A imagem do gel foi obtida e processada por meio do sistema de fotodocumentação L-Pix Chemi (Loccus Biotecnologia), com auxílio do programa L-Pix Image. A quantificação foi realizada com marcadores de quantidade de DNA de fago lambda nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 ng. µL⁻¹.

Após a quantificação, os produtos de PCR foram purificados com o KIT *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) e o produto purificado foi submetido à reação de seqüenciamento utilizando-se o kit *DYEnamic™ ET dye terminator* (MegaBACE™, GE Healthare), juntamente com os *primers* 5F e 531r (individualmente). As amostras foram processadas em sequenciador automático MegaBACE 1000 (Molecular Dynamics), seguindo-se as recomendações do fabricante. As identidades das seqüências nucleotídicas foram comparadas àquelas armazenadas no banco de dados do *National Center for Biotecnology Information* (NCBI). O alinhamento das bases foi realizado com o auxílio do algoritmo Clustal W, seguindo-se correção manual com o programa Mega 5.0 (Tamura *et al.* 2007).

3.8. Preservação das linhagens bacterianas

Os isolados selecionados foram cultivados em placas contendo meio sólido Bacto™ – Tryptic Soy Broth (BD) e incubados a 30 °C por 24 h. Em seguida, realizou-se a repicagem das colônias para tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo BD, seguindo-se incubação a 30 °C e 150 rpm por 24 h. 1 mL de cada amostra foi transferido para microtubos de 1,5 mL de capacidade e centrifugado a 12.400 X g por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e ao *pelet* foram adicionados 600 µL de caldo BD e 400 µL de glicerol a 80 %. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80 °C.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento das bactérias produtoras de biossurfactantes

As 12 amostras de solos selecionados para triagem de bactérias produtoras de biossurfactantes foram identificadas como pertencentes à classe dos Neossolos e Cambissolos, com material de origem majoritariamente de natureza vulcânica. A maioria das amostras mostrou textura franca com conteúdo de matéria orgânica total variando de 1,87 % no ponto de coleta P10 a 8,46 % no ponto P01 (Figura 1 e Tabela 2). O pH foi variável e somente no ponto P02 foi observado valor alcalino (Tabela 2) diferente dos solos ácidos das demais amostras. A contagem de bactérias que puderam ser cultivadas nas condições estabelecidas foi invariavelmente de 10^5 UFC g⁻¹ (Tabela 2), com exceção do solo P01 (Figura 1), cuja contagem foi duas ordens de magnitude maior, resultado atribuído ao maior conteúdo de matéria orgânica (Tabela 2).

Durante a triagem em meio ágar-sangue, 93 isolados apresentaram atividade hemolítica (Tabela 2), dos quais 31 foram confirmados como produtores de biossurfactantes pelo método do espalhamento do óleo, após serem cultivados em caldo TSA contendo 50 g.L⁻¹ de NaCl.

A proporção de colônias com atividade hemolítica, em relação ao número total de colônias nas placas de ágar-sangue, variou amplamente entre as diferentes amostras (Tabela 2). Nas amostras P09 e P10, nenhuma colônia com atividade hemolítica foi encontrada, dentre 65 e 205 colônias totais, respectivamente. Ambos os pontos P01 e P05 tiveram valores mais elevados na proporção de colônias com atividade hemolítica (27,2 % e 22,8 %) respectivamente. Nas demais amostras essa proporção foi variável entre 12,3 % e 1,86 %.

Tabela 2. Características dos solos e resultado de triagem de bactérias produtoras de biossurfactantes

Amostra de solo/ Localização	Textura	^a MO (%)	pH H ₂ O	UFC/g de solo	Nº de colônias com atividade hemolítica/ Nº total de colônias (%)	^b Isolados produtores de biossurfactante – caldo TSA	^c Isolados produtores de biossurfactantes - meio mineral
P01							
20°31'17,70"S 29°18'19,30"O	Franco-Argiloso	8,46	5,94	(1,2 ± 0,07) x 10 ⁷	27,2	8	1
P02							
20°30'38,40"S 29°18'30,60"O	Areia-Franca	2,37	7,78	(1,3 ± 0,28) x 10 ⁶	12,3	4	1
P03							
20°30'32,70"S 29°18'33,50"O	Franco	2,61	5,94	(5,4 ± 1,48) x 10 ⁶	7,2	3	1
P04							
20°30'5,80"S 29°19'15,70"O	Franco	6,84	6,81	(8,8 ± 0,07) x 10 ⁵	5,6	3	2
P05							
20°30'16,47"S 29°19'11,74"O	Argila-Siltosa	4,98	6,50	(3,5 ± 0,98) x 10 ⁶	22,8	4	1
P06							
20°30'55,70"S 29°19'2,40"O	Argila	4,73	6,17	(2,0 ± 0,42) x 10 ⁵	1,9	3	3
P07							
20°30'54,90"S 29°18'56,60"O	Argila	4,60	6,18	(1,6 ± 0,14) x 10 ⁶	1,8	2	2
P08							
20°31'1,12"S 29°19'18,67"O	Argila-Siltosa	4,98	6,72	(2,2 ± 0,28) x 10 ⁵	4,4	3	2
P09							
20°31'0,60"S 29°19'26,18"O	Franco	2,61	5,95	(6,5 ± 1,90) x 10 ⁵	0	0	0
P10							
20°30'8,27"S 29°20'9,92"O	Franco	1,87	6,54	(2,2 ± 0,28) x 10 ⁵	0	0	0
P11							
20°30'3,70"S 29°20'9,65"O	Franco-Argila-Siltosa	4,97	6,72	(1,9 ± 0,42) x 10 ⁵	3,5	1	1
P12							
20°30'57,29"S 29°19'22,82"O	Franco	1,99	6,30	(5,4 ± 6,22) x 10 ⁵	3,7	0	0

^aMO, matéria orgânica;

^bIsolados produtores de biossurfactantes cultivados em caldo TSA salino e testados com método de espalhamento de óleo);

^cIsolados produtores de biossurfactantes cultivados em meio mineral e testados com método do espalhamento de óleo).

Os 31 isolados identificados como produtores de biossurfactante foram novamente cultivados a 30 °C em caldo ME acrescido de 50 g.L⁻¹ de NaCl (Tabela 1), para posterior quantificação de biossurfactantes pelo método do Espalhamento de Óleo. Nessa etapa, 14 isolados foram selecionados como bons produtores de biossurfactantes (Tabela 3). O critério adotado para essa seleção foi a formação de halo com diâmetro superior a 2,5 cm, o que corresponde a uma concentração de biossurfactante (relativa à da surfactina) de 44,4 mg.L⁻¹ (Figura 2).

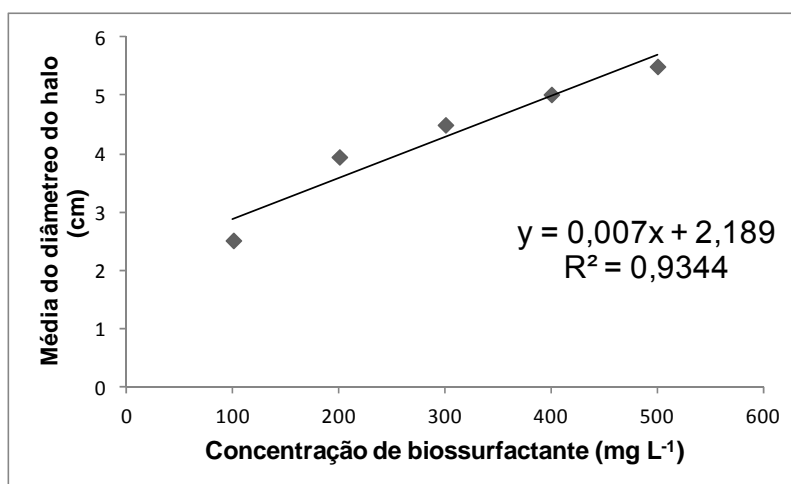


Figura 2. Diâmetro do halo de espalhamento de óleo em função da concentração de surfactina comercial (Sigma) (Fernandes, 2011).

As maiores concentrações (relativas à surfactina) de biossurfactantes nos extratos semi-purificados foram obtidas a partir dos meios de cultivo inoculados com os isolados TR 13 (373,0 mg.L⁻¹), TR 35II (358,7 mg.L⁻¹) e TR 14 (330,1 mg.L⁻¹) (Tabela 3). As concentrações relativas de biossurfactantes nos extratos semi-purificados obtidos a partir do cultivo dos demais isolados variaram entre 144,4 e 273,7 mg.L⁻¹, com exceção de TR 19 e TR 7, que produziram biossurfactantes em menor concentração relativa (44,4 mg.L⁻¹), (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração relativa de biossurfactantes produzidos por isolados selecionados e cultivados em meio ME Salino por 7 dias a 30 °C e 200 rpm

Isolado	Diâmetro (cm)	Concentração de biossurfactante (mg L ⁻¹)*
TR 27II	3,6	201,6
TR 10	4,1	273,0
TR 19	2,5	44,4
TR 14	4,5	330,1
TR 8	3,5	187,3
TR 7	2,5	44,4
TR 47II	4	258,7
TR 17	3,2	144,4
TR 35II	4,7	358,7
TR 22	3,7	215,9
TR 59II	3,3	158,7
TR 13	4,8	373,0
TR 27	3,5	187,3
TR 12	3,8	230,1
BCO	0	0

* Os valores correspondem à concentração relativa de biossurfactantes nos extratos aquosos, obtidos após a precipitação das moléculas por HCL (pH = 2,0) e ressuspensão em água. A concentração foi estimada a partir de curva de regressão entre diâmetro do halo de espalhamento de petróleo cru e concentração do biossurfactante comercial Surfactina (Sigma).

4.2. Efeito da concentração de NaCl sobre a tensão interfacial

Houve redução significativa da tensão interfacial entre o hexadecano (fase leve) e os extratos de biossurfactantes purificados, após cultivo em meio ME dos 14 isolados listados na Tabela 3, o que confirma a presença de biossurfactantes efetivos nesses extratos.

A mensuração da tensão interfacial em função da concentração salina foi realizada até se observar a estabilidade da leitura, o que ocorreu na faixa entre 100 e 150 g.L⁻¹ de NaCl para todos os isolados. Exceções foram as amostras TR 13 e TR 14, que mantiveram queda nos valores de TI até 175 g.L⁻¹ de NaCl (Figura 3).

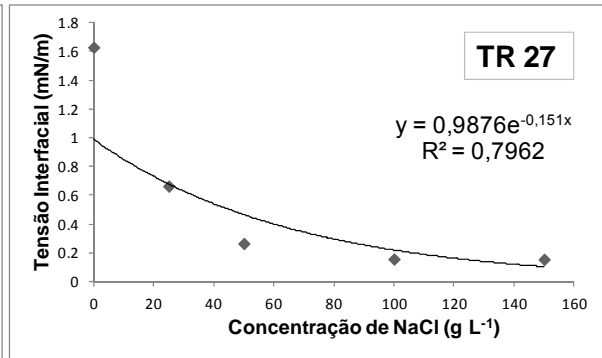
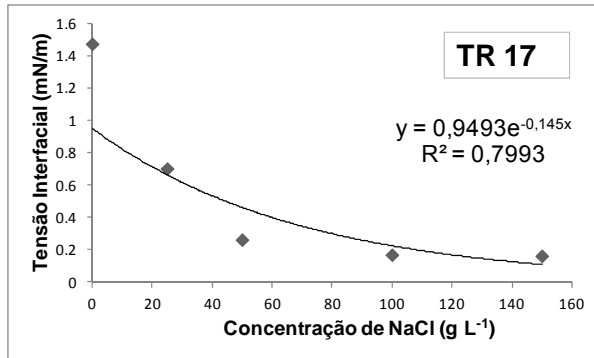
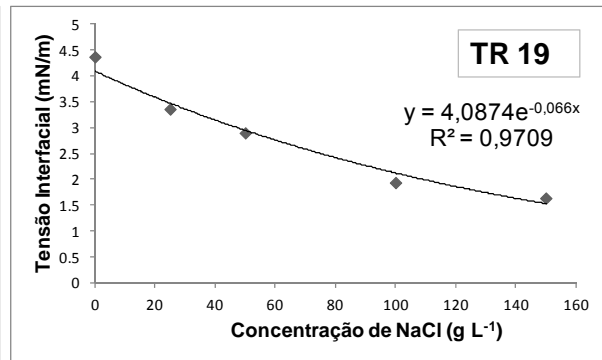
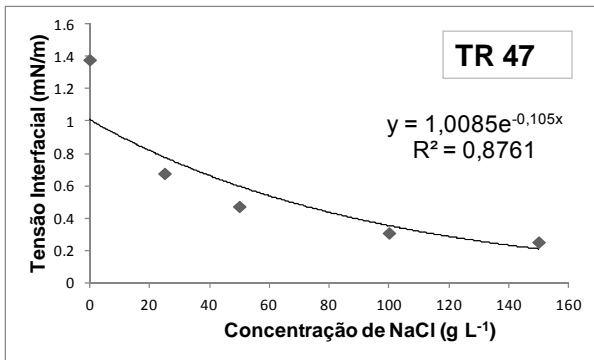
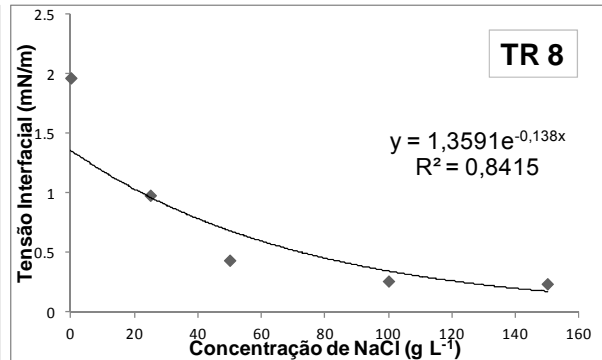
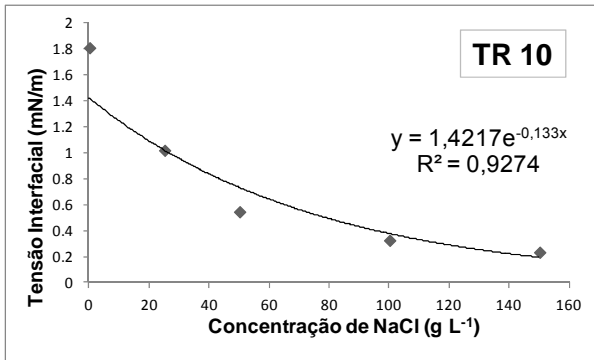
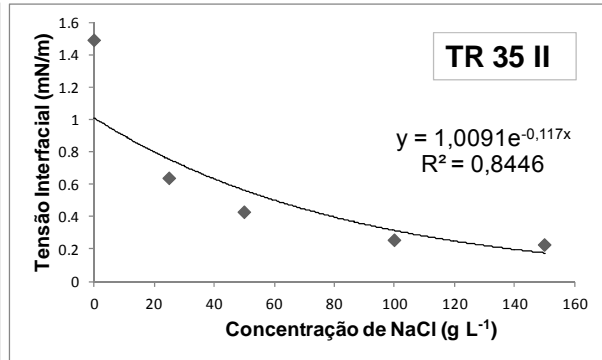
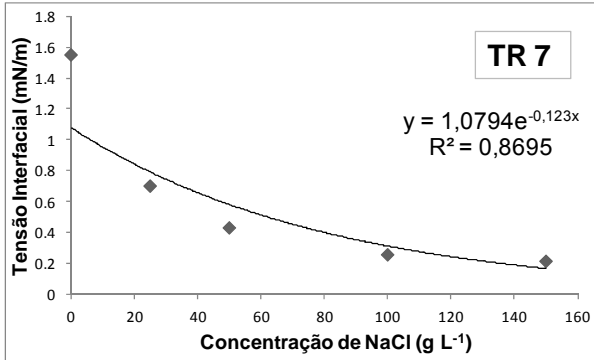
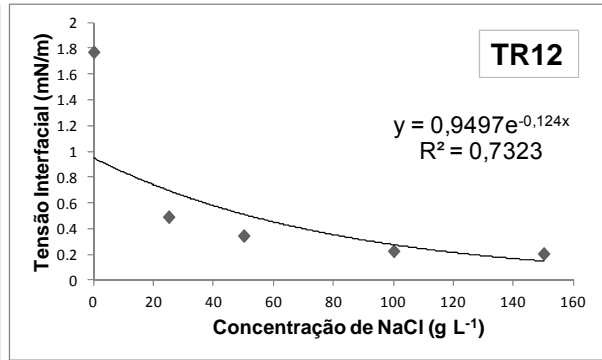
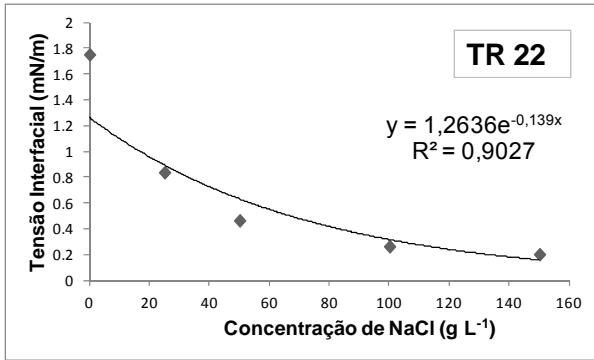
Os extratos obtidos com os isolados TR 13 e TR 14 apresentaram os menores valores de tensão interfacial a uma maior concentração de sal do que os extratos dos demais isolados. O extrato de TR 13 teve a TI reduzida de $2,00 \text{ mN.m}^{-1}$ (sem adição de sal) para $0,156 \text{ mN.m}^{-1}$, na concentração de 175 g.L^{-1} de NaCl; a TI do extrato do TR 14 foi reduzida de $2,29 \text{ mN.m}^{-1}$ a $0,198 \text{ mN.m}^{-1}$, nas mesmas concentrações salinas (Figura 3).

Os extratos obtidos com os isolados TR 17, TR 27, TR 27 II e TR 59 II, (Figura 3) apresentaram valores estáveis de TI entre as concentrações de 100 a 150 g.L^{-1} de NaCl. O extrato do isolado TR 17 apresentou redução na TI de $1,47 \text{ mN.m}^{-1}$, sem adição de sal, para $0,159 \text{ mN.m}^{-1}$, com 150 g.L^{-1} de NaCl. Nas mesmas condições, a TI do extrato TR 27 foi reduzida de $1,63 \text{ mN.m}^{-1}$ para $0,155 \text{ mN.m}^{-1}$; a do extrato TR 27 II foi reduzida de $1,630 \text{ mN.m}^{-1}$ para $0,144 \text{ mN.m}^{-1}$ e a do extrato TR 59 II, de $1,90 \text{ mN.m}^{-1}$ para $0,187 \text{ mN.m}^{-1}$.

Os demais isolados (TR 22, TR 12, TR 7, TR 35II, TR 10, TR 8, TR 47II e TR 19 (Figuras 3) foram menos eficazes na diminuição da tensão interfacial, embora tenham apresentado valores baixos de TI entre 100 e 150 g.L^{-1} de NaCl.

O resultado mais discrepante foi o obtido com o extrato do isolado TR 19, cujos valores de TI variaram entre $4,37 \text{ mN.m}^{-1}$, sem adição de sal, e $1,64$, com adição de 150 g L^{-1} de NaCl. O maior valor de TI na ausência de NaCl, comparativamente aos valores obtidos com os demais isolados, e o menor efeito da adição de NaCl sobre a redução da TI, podem ser atribuídos à baixa concentração relativa de biossurfactante produzido por esse isolado, nas condições experimentais do trabalho (Tabela 3). A relação inversa entre a concentração de biossurfactantes e a TI com hexadecano já foi demonstrada (Fernandes, 2011).

A adição de NaCl ao extrato das culturas de todos os isolados promoveu uma redução exponencial da tensão interfacial hexadecano-água (Figuras 3 a 5). O maior efeito da salinidade foi observado com a amostra TR 19, cuja tensão interfacial foi reduzida de aproximadamente $4,37 \text{ mN.m}^{-1}$, na ausência de NaCl, para $0,156 \text{ mN.m}^{-1}$, quando o sal foi adicionado em uma concentração de 175 g.L^{-1} .



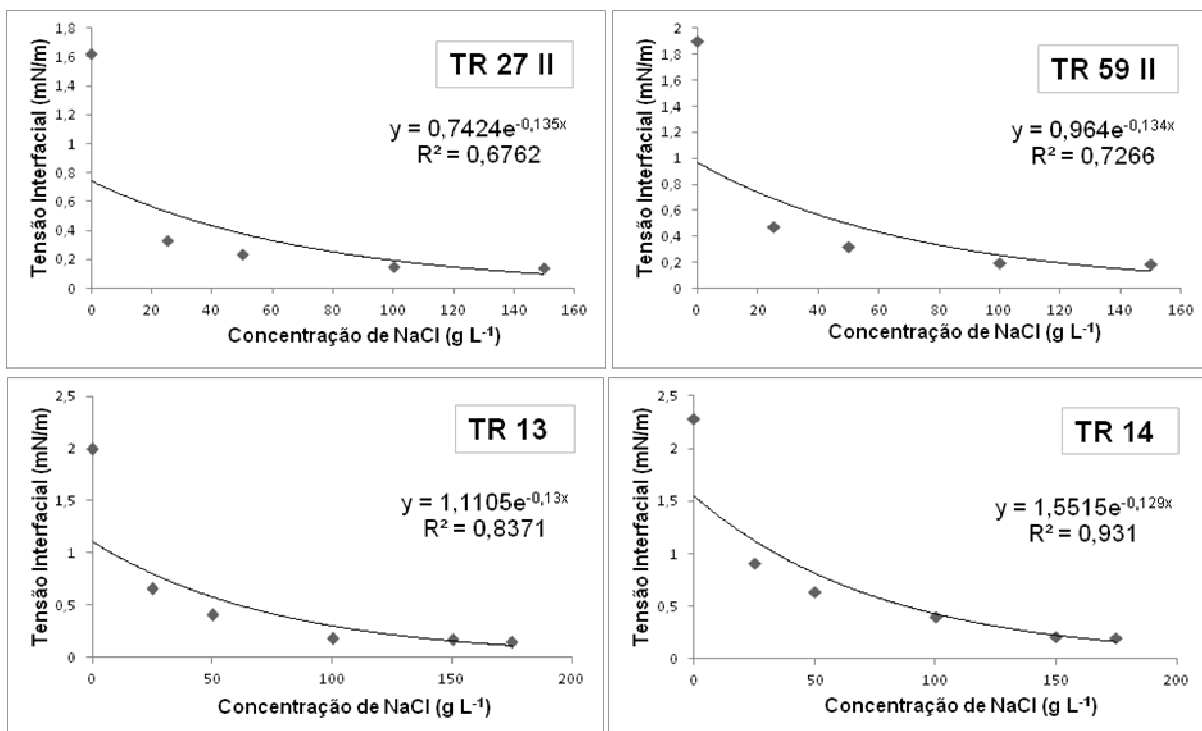


Figura 3. Efeito da concentração de NaCl na tensão interfacial dos extratos de biosurfactantes purificados. As mensurações foram feitas utilizando hexadecano como fase leve.

4.3. Efeito da concentração de NaCl sobre a tensão superficial

Todos os 14 isolados foram capazes de produzir biosurfactantes com competência para reduzir as tensões superficiais do meio ME (Tabela 1) para valores inferiores a 40 mN.m⁻¹, o que os caracteriza como produtores de biosurfactantes com forte atividade superficial (Tabela 4).

Enquanto 20 a 30 g.L⁻¹ de NaCl são o suficiente para desestabilizar surfactantes químicos (Banat, 1995), os biosurfactantes produzidos pelos isolados TR 13 e TR 14 mantiveram a atividade a uma concentração de 175 g.L⁻¹ de NaCl (Figura 4). Os biosurfactantes produzidos por esses dois isolados também foram os que apresentaram os menores valores de tensão superficial (26,10 a 26,7 mN.m⁻¹) em soluções contendo 150 g L⁻¹ de NaCl (Tabela 4). Na concentração de 175 g.L⁻¹, as tensões superficiais dos extratos dos dois isolados apresentaram um pequeno aumento, para $27 \pm 0,05$ mN.m⁻¹.

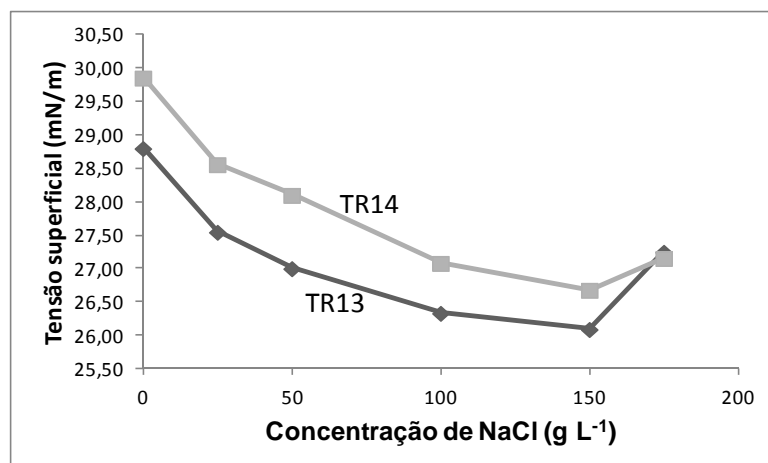


Figura 4. Valores de Tensão Superficial em função da concentração salina dos isolados TR 13, e TR 14. Erro padrão inferior a 0,05.

Os biossurfactantes produzidos pelos demais isolados apresentaram a maior atividade de redução da tensão superficial na presença de NaCl a 100 g.L⁻¹, com exceção do isolado TR 19, cujos valores de TS aumentaram a partir de 25 g.L⁻¹ de NaCl (Tabela 4). Os valores de TS do extrato desse isolado foram também os mais elevados. Tendo em conta que a concentração de biossurfactantes no extrato de TR 19, relativa à surfactina comercial Sigma, foi a menor entre os isolados avaliados (juntamente com o isolado TR 07), é factível considerar que a atividade do(s) biossurfactante(s) produzido(s) por esse isolado possa ser similar ou mesmo superior à atividade dos biossurfactantes produzidos pelos outros isolados. Isso pode ocorrer caso a concentração de biossurfactantes no extrato TR 19 seja menor do que a sua CMC. Com o extrato do isolado TR 07 não foi observado resultados elevados, tanto da tensão interfacial (Figura 3, TR 7) quanto da superficial (Tabela 4). O fato do mesmo apresentar concentração relativa de biossurfactante igualmente reduzida (Tabela 3) pode ser atribuído a uma menor CMC dos biossurfactantes por ele produzidos, comparativamente aos biossurfactantes produzidos por TR 19.

Tabela 4. Valores de Tensão Superficial em relação a diferentes concentrações salinas, dos isolados produtores de biossurfactantes.

Isolados	Tensão Superficial (mN/m) / Concentração de NaCl (g L ⁻¹)					
	0	25	50	100	150	175
TR 13	28,80 ± 0,03	27,55 ± 0,03	27,01 ± 0,03	26,34 ± 0,05	26,10 ± 0,05	27,25 ± 0,05
TR 14	29,85 ± 0,04	28,56 ± 0,04	28,10 ± 0,04	27,09 ± 0,05	26,69 ± 0,05	27,16 ± 0,05
TR 12	29,45 ± 0,04	28,86 ± 0,05	28,45 ± 0,05	27,92 ± 0,05	28,86 ± 0,05	-
TR 27	29,17 ± 0,04	28,48 ± 0,05	28,11 ± 0,04	27,96 ± 0,05	28,84 ± 0,05	-
TR 59 II	28,85 ± 0,05	28,32 ± 0,05	28,21 ± 0,05	27,87 ± 0,05	29,29 ± 0,05	-
TR 22	29,39 ± 0,04	28,66 ± 0,04	28,38 ± 0,05	27,31 ± 0,05	28,17 ± 0,05	-
TR 35 II	28,84 ± 0,03	28,10 ± 0,04	27,63 ± 0,05	27,13 ± 0,05	28,14 ± 0,05	-
TR 17	28,87 ± 0,04	28,27 ± 0,05	28,26 ± 0,05	27,74 ± 0,05	28,38 ± 0,05	-
TR 47 II	28,45 ± 0,04	27,71 ± 0,05	27,32 ± 0,04	26,83 ± 0,05	27,69 ± 0,05	-
TR 7	29,12 ± 0,05	28,24 ± 0,04	27,80 ± 0,04	27,18 ± 0,05	27,49 ± 0,05	-
TR 8	30,17 ± 0,05	29,33 ± 0,05	28,96 ± 0,04	28,49 ± 0,05	28,51 ± 0,05	-
TR 19	35,57 ± 0,05	35,50 ± 0,05	36,92 ± 0,05	38,08 ± 0,05	38,35 ± 0,05	-
TR 10	29,65 ± 0,04	28,80 ± 0,04	28,36 ± 0,05	27,49 ± 0,05	27,99 ± 0,05	-
TR 27 II	28,73 ± 0,04	28,22 ± 0,04	27,91 ± 0,05	27,63 ± 0,05	28,22 ± 0,05	-

4.4. Identificação dos isolados

A análise dos perfis de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), utilizando o sistema Sherlock® (MIDI), permitiu determinar a identidade de 12 dentre os 14 isolados obtidos, com base na biblioteca de referência ITSA 1.0 e IR2A 1.0 (Tabela 5). Todos os 12 isolados identificados nessa fase pertencem a espécies do Filo Firmicutes, gênero *Bacillus*, a saber: *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *B. subtilis* subsp. *subtilis* e *B. atropheaeus* (Tabela 5).

Isolado	Identificação de isolados pelo perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME)	Índice de Similaridade (IS)
TR 7	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> GC subgrupo A.	0,412**
TR 8	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> subgrupo D	0,728*
TR 10	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	0,421**
TR 12	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> subgrupo D	0,698*
TR 13	<i>Bacillus atropheaeus</i>	0,313**
TR 14	<i>Bacillus atropheaeus</i>	0,312**
TR 17	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	0,380*
TR 19	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	0,379*
TR 22	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> subgrupo D	0,523*
TR 27	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	0,365*
TR 27 II	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	0,528*
TR 35 II	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> subgrupo D	0,528*

Tabela 5.
Identificação dos isolados pelo perfil ésteres metílicos de ácidos graxos.

TR 47 II	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> subgrupo A	0,550*
TR 59 II	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	0,475**

* Isolados obtidos a partir da análise da composição de ácidos graxos com base na biblioteca do método IR2A 1 1.00.

** Isolados obtidos a partir da análise da composição de ácidos graxos com base na biblioteca do método ITS2A 1 1.00.

Os perfis de ácidos graxos obtidos dos 14 isolados estudados foram submetidos à análise de agrupamento baseada na distância Euclidiana, empregando-se o próprio software de identificação (Sherlock[®], MIDI). Essa análise foi feita para se detectar a presença de diferentes isolados possivelmente

pertencentes a uma mesma cepa, e tem como princípio que amostras com Distância Euclidiana acima de 2,5 pertencem a cepas distintas. Durante a etapa de identificação, os extratos de FAME foram analisados com dois métodos distintos e com suas respectivas bibliotecas de referência (ITSA 1.0 e IR2A 1.0). Devido à incapacidade do *software* de unir os resultados das bibliotecas ITSA 1.0 e IR2A 1.0, foram elaborados dois Dendrogramas. Em função disso, nas análises de agrupamento foram empregados os perfis obtidos com o método que forneceu o maior valor de IS (Índice de Similaridade) para cada isolado.

Os isolados cujo maior valor de IS foram obtidos com o método ITSA 1.0 foram o TR 13 e TR 14 (identificados como *Bacillus atrophaeus*), os isolados TR 10 e TR 59 II (*B. subtilis* subsp. *spizizenii*) e o isolado TR 7, identificado como *Bacillus subtilis* (Figura 5).

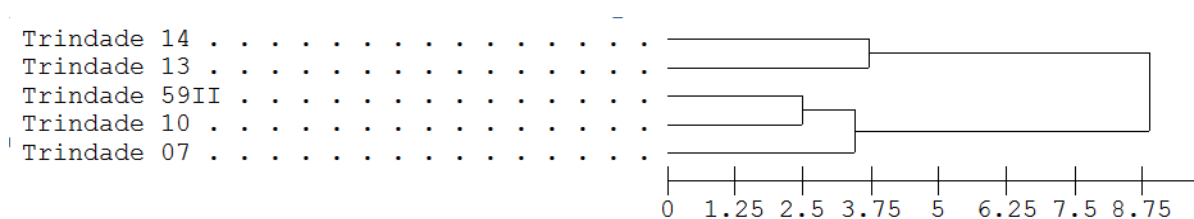


Figura 5. Dendrograma construído com base na Distância Euclidiana dos perfis de ácidos graxos dos isolados da Ilha da Trindade, analisados pelo método ITSA 1.00 (MIDI).

Com base na análise de agrupamento (Figura 5), os isolados TR 10 e TR 59II, ambos identificados como *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, podem em princípio ser considerados como pertencentes à mesma cepa. Isso não é necessariamente verdadeiro, uma vez que o método apenas assegura que amostras com Distância Euclidiana acima de 2,5 pertencem a cepas distintas. Deve-se considerar que os micro-organismos acima referidos foram isolados de diferentes amostras de solo (Tabela 6). Além disso, os dados de Tensão Interfacial em resposta ao aumento da concentração salina da solução (Figuras 3) permitem concluir que, a despeito da grande similaridade entre os perfis de ácidos graxos desses isolados, eles pertencem a cepas distintas. A atividade interfacial dos biossurfactantes produzidos por TR 59II é mais fortemente e positivamente afetada pelo aumento da salinidade, o que se traduz em queda mais abrupta da tensão interfacial com o aumento da

concentração salina na solução (ver Figura 3 – isolado TR 59II, em comparação com a Figura 3 – isolado TR 10).

Os demais isolados apresentaram maiores IS quando os seus extratos de FAME foram analisados com o método IR2A 1 (Tabela 5). Os isolados TR 35II, TR 22, TR 12 e TR 8 foram identificados como *Bacillus subtilis* GC subgrupo D e o isolado TR 47 II foi identificado como *Bacillus subtilis* GC subgrupo A. Os isolados TR 27, TR 19, TR 17 e TR 27II foram identificados como *B. subtilis* subsp. *spizizenii*. Os resultados de identificação são coerentes com a separação de dois ramos a uma Distância Euclidiana de 8,75, correspondentes aos grupo de *B. subtilis* e *B. subtilis* subsp. *spizizenii* (Figura 6). Assim como discutido anteriormente em relação aos isolados TR 10 e TR 59II, as Distâncias Euclidianas dos extratos de FAME dos isolados TR 22/ TR35II, TR 8/ TR12 e TR19/ TR27 apresentaram valores inferiores ao definido como critério de separação das amostras em cepas distintas. Não houve grandes diferenças nos dados de tensão interfacial X salinidade entre os isolados TR22 (Figura 3A) e TR 35II (Figura 3D), exceto nas menores concentrações de NaCl (0 e 25 g.L⁻¹), o que pode indicar que eles pertencem a cepas distintas. Diferenças mais amplas nas variações de tensão interfacial X salinidade foram encontradas entre os isolados TR 8/ TR12 (Figuras 3F e 3B) e, especialmente, entre os isolados TR19/ TR27 (Figuras 3H e 3J), que foram assim definidos como sendo pertencentes a cepas distintas, ainda que com perfis de ácidos graxos muito similares entre si (Figura 6).

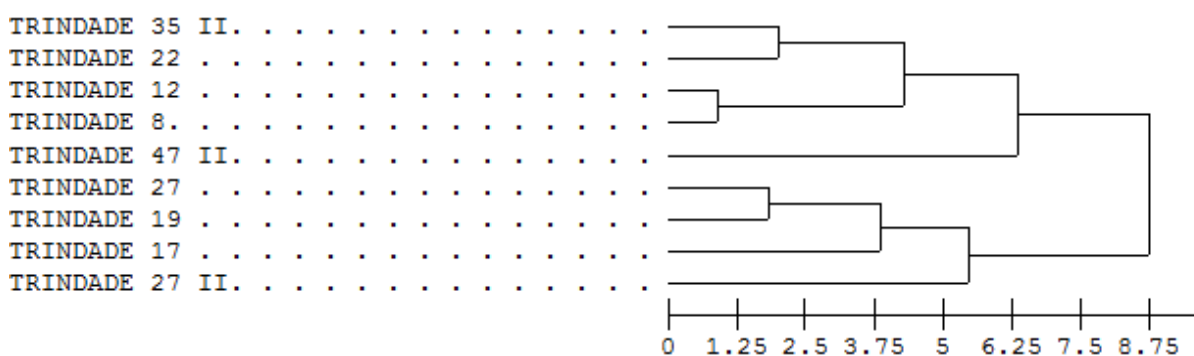


Figura 6. Dendrograma construído com base na distância euclidiana dos isolados a partir da análise da composição de ácidos graxos. Biblioteca do método IR2A 1 1.00.

5.5. Extração de DNA, amplificação, sequenciamento e análise de sequencias do rDNA 16S

Complementar à análise pelo sistema MIDI, os 14 isolados foram identificados com base na sequência parcial do gene rDNA 16S. As sequências obtidas foram comparadas às pertencentes ao banco de dados no NCBI, com o auxílio da ferramenta BLAST. Os valores de identidades variaram entre 89 e 98 % (Tabela 6).

Com outro parâmetro utilizado nas análises (*E-value*), pode-se inferir que os valores de identidade das sequências foram confiáveis (Tabela 6).

Tabela 6. Comparações entre as sequências de rDNA 16S dos isolados de bactérias produtoras de biossurfactantes depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Isolado	Descrição (NCBI)	Número do acesso	<i>E-value</i>	Identidade %	Amostra de origem
TR 7	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain DSM 10	NR_027552.1	0.0	95 %	P11
TR 8	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain DSM 10	NR_027552.1	0.0	95 %	P07
TR 10	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> strain NRRL B-23049	NR_024931.1	0.0	97 %	P07
TR 12	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain DSM	NR_027552.1	0.0	97 %	P06
TR 13	[<i>Brevibacterium</i>] <i>halotolerans</i> strain DSM 8802	NR_042638.1	0.0	97 %	P06
TR 14	[<i>Brevibacterium</i>] <i>halotolerans</i> strain DSM 8802	NR_042638.1	3e ⁻¹⁸⁰	97 %	P06
TR 17	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> strain NRRL B-23049	NR_024931.1	1e ⁻¹²⁸	89 %	P03
TR 19	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> strain NRRL B-23049	NR_024931.1	0.0	95 %	P04
TR 22	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain DSM 10	NR_027552.1	0.0	98 %	P04
TR 27	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> strain NRRL B-	NR_024931.1	3e ⁻¹⁵⁹	93 %	P08

TR 27 II	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> strain NRRL B-23049	NR_024931.1	9e ⁻¹⁴⁵	96 %	P08
TR 35 II	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain DSM 10	NR_027552.1	0.0	95 %	P05
TR 47 II	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain DSM 10	NR_027552.1	0.0	95 %	P02
TR 59 II	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> strain NRRL B-23049	NR_024931.1	2e ⁻¹⁶⁰	89 %	P01

O resultados do sequenciamento do rDNA 16S dos isolados foram compatíveis com aqueles obtidos pelos perfis de ácidos graxos, com exceção de TR 13 e TR 14, que apresentaram identidade de 97 % com *Brevibacterium halotolerans* strain DSM 8802. Porém, de acordo com a análise pelo sistema MIDI, esses foram identificados como *Bacillus atrophaeus*, gerando ambiguidade sobre a real classificação desses isolados. No entanto, de acordo com os padrões observados nas atividades tensoativas com alta concentração salina (175 g.L⁻¹ de NaCl) dos compostos produzidos por TR 13 e TR 14 (Figuras 3 e 4) e pela característica de crescimento em meio de cultura com 50 a 150 g.L⁻¹ de NaCl, pode-se presumir que a identificação como *Brevibacterium halotolerans* seja a mais provável.

Os demais isolados foram identificados como *Bacillus subtilis* tanto pelo perfil de ácidos graxos como pela análise da sequência do rDNA 16S. Nesse contexto, diante dos resultados obtidos, moléculas surfactantes com alta eficiência em condições salinas foram produzidas por micro-organismos isolados de ambiente não antropizado, abrindo com isto um novo leque de possibilidades de bioprospecções com esse intuito.

6. DISCUSSÃO

Devido ao isolamento geográfico, as ilhas oceânicas são ambientes únicos, onde se insere a Ilha da Trindade no conceito de ambiente prístino. A formação geológica e evolução biológica particular destes ambientes ímpares conferem alto grau de endemismo, não somente referente à flora e fauna, mas também a solos com características diferenciadas em relação àqueles encontrados nos continentes (Clemente et al. 2009). Este trabalho mostra que a extensão endêmica também pode ser atribuída a microbiota, como os isolados prospectados cuja capacidade de produzir biossurfactantes evidenciou grande potencial de aplicação tecnológica. Apesar desta importância, só há na literatura trabalhos referentes a procariotos de ilhas oceânicas em regiões de alta latitude, como ambientes da península antártica.

Dentre estes, destaca-se o trabalho realizado com solos em condições semelhantes de formação geológica e também mesma gênese de origem vulcânica, localizados na região do Mar de Ross, Antártica. Apesar das diferentes condições climáticas em relação à Ilha da Trindade, o autor reportou contagem de colônias microbianas com valores máximos de $1,1 \times 10^8$ UFC g⁻¹, em amostras com conteúdo de matéria orgânica de 11,7 %, e valores mínimos de $5,3 \times 10^3$ UFC g⁻¹, em solo com baixo teor de matéria orgânica (0,03 %) (Aislabie et al., 2008).

Na amostra de solo P01 da Ilha da Trindade (Figura 1), a contagem de UFC g⁻¹ foi duas ordens de magnitude maior que os demais pontos. Este valor foi atribuído ao maior conteúdo de matéria orgânica (Tabela 2) devido ao fato de que este era o único ponto amostrado com presença de vegetação abundante. Nos demais pontos amostrais o solo encontrava-se desnudo, com vegetação esparsa ou ausente, não ocorrendo assim efeito rizosférico influente na contagem de bactérias cultivadas.

Condições de pH neutro são mais adequados para a maioria das espécies bacterianas, porém um grande aporte de matéria orgânica pode ser compensatório, favorecendo o desenvolvimento desses micro-organismos mesmo sob condições sub-ótimas de pH. Esse padrão pode ser observado em perfis de comunidades bacterianas em solos ornitogênicos, caracterizados pelo elevado conteúdo de matéria orgânica em decorrência do guano de aves em áreas de nidificação, em contraste com solos minerais, geralmente pobres em nutrientes (Aislabie et al., 2008).

Os valores de pH encontrados nas 12 amostras não sugerem elevadas concentrações de sódio no solo. Porém um subsídio pertinente a bioprospecção de bactérias produtoras de biossurfactante ativos em alta concentração salina provém da característica da matriz rochosa da Ilha da Trindade. A série vulcânica oceânica da cadeia geológica ao qual pertence à ilha é altamente subsaturada em sílica e a mais sódico-alcálica do Oceano Atlântico, sendo possivelmente a mais sódica do mundo (Almeida, 2002). Todos os 12 pontos amostrais foram coletados de solos com perfis delgados (10 cm de profundidade), com algumas repetições possuindo profundidades inferiores, devido ao afloramento da rocha matriz. Possivelmente os isolados halófilos selecionados tenham esta adaptação metabólica em razão da dispersão sódica da matriz rochosa saturada em sais.

Os isolados foram selecionados com sucesso a partir de meios de cultura ágar sangue salino, com a finalidade de selecionar os metabólitos de interesse ativos nestas condições. Bactérias produtoras de biossurfactantes, de modo geral, apresentam atividade hemolítica, sendo essa atividade o princípio do método rápido de triagem empregado, com o que se reduz o número de bactérias selecionadas para os testes confirmativos subsequentes (Youssef *et al.*, 2004). Além de qualitativo, alguns autores utilizam o teste de hemólise como um método semi-quantitativo da produção de biossurfactantes (Yonebayashi *et al.* 2000). O teste de hemólise em ágar-sangue foi utilizado para quantificar a surfactina produzida por *B. subtilis* (Moran *et al.*, 2002). Similarmente, ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* já foram quantificados com esse método (Johnson e Boese-Marrazzo 1980). No entanto, em alguns casos, o efeito da hemólise pode reproduzir resultados falsos-positivos (Youssef *et al.*, 2004). Por isso, é essencial a confirmação da produção de biossurfactantes por ensaios como o teste de Colapso de Gota ou o Método do Espalhamento de Óleo (Bharali *et al.* 2011).

Destaca-se que as concentrações reportadas são estimadas com base nos diâmetros dos halos de espalhamento de óleo das amostras, em comparação com o espalhamento resultante da adição de surfactina comercial (Sigma). Portanto, os valores apresentados correspondem a uma atividade de espalhamento de óleo pelos biossurfactantes presentes nas amostras. Essa atividade, em condições-padrão de ensaio, depende fundamentalmente de dois fatores: concentração de moléculas surfactantes e atividade interfacial das moléculas. Isso equivale a dizer que duas

amostras contendo uma mesma concentração de biossurfactantes podem apresentar atividade (diâmetro) de espalhamento de óleo diferente, em razão das diferenças na forma como agem na interface entre o óleo e água.

Como observado (Tabela 2), houve grande variação entre o número total de colônias em relação ao número colônias com atividade hemolítica nas placas de Agar-sangue. Porém são desconhecidas as razões para essas diferenças na proporção encontrada nas amostras de solo da Ilha da Trindade. Em ambientes com histórico de contaminação por substratos hidrofóbicos, a proporção de micro-organismos produtores de biossurfactantes tende a aumentar, em razão da vantagem competitiva conferida pelo aumento da biodisponibilidade desses substratos (Bodour *et al.* 2003). Já em ambientes prístinos, essas variações devem ser decorrentes de diferenças tanto na quantidade quanto na qualidade da matéria orgânica.

As moléculas com propriedades surfactantes identificadas nos extratos purificados dos 14 isolados selecionados tiveram redução significativa da tensão interfacial. Também em condições similares de salinidade, Fernandes (2011) demonstrou que a adição de NaCl ao sobrenadante da cultura de *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 promoveu redução exponencial da tensão interfacial hexadecano-água, que passou de $1,5 \text{ mN.m}^{-1}$, na ausência de NaCl, para $0,099 \text{ mN.m}^{-1}$, quando o sal foi adicionado em uma concentração de 120 g.L^{-1} de NaCl. A redução da TI em resposta ao aumento da salinidade da fase aquosa se deve ao fato de que a alteração da salinidade da fase aquosa altera também a solubilidade relativa do surfactante, levando a uma mudança do coeficiente de partição da molécula entre as duas fases. O aumento da concentração salina da fase aquosa promove a migração das moléculas surfactantes para a fase oleosa, reduzindo a concentração do surfactante na fase aquosa. Portanto, a concentração de sal que propicia o menor valor de tensão interfacial é aquela capaz de promover o equilíbrio da distribuição do surfactante entre as fases aquosa e oleosa. O aumento da concentração salina para valores acima da concentração ótima levam novamente ao aumento da tensão interfacial (Sharma e Shah, 1989).

As tensões interfaciais obtidas podem ser consideradas baixas o suficiente para reduzir significativamente as forças capilares que previnem a movimentação do petróleo em sistemas porosos, atestando o potencial dos biossurfactantes

produzidos pelos isolados obtidos para utilização em processos de recuperação melhorada de petróleo (Fernandes, 2011), assim como em outras aplicações biotecnológicas.

Assim como nos ensaios de tensão interfacial, os 14 isolados foram efetivos nas análises de tensão superficial. A redução dos valores aferidos nos extratos purificados por estes isolados (valores inferiores a 40 mN.m^{-1}), os caracterizaram como produtores de biossurfactante com forte atividade superficial em concentrações muito elevadas de sal (Tabela 4), com exceção dos isolados TR 19 e TR 07. Porém não se pode, com base nesses resultados, afirmar que o(s) biossurfactante(s) produzido(s) por ambos os micro-organismos seja(m) menos ativo(s) do que os biossurfactantes produzidos pelos outros isolados, porque a tensão superficial é inversamente proporcional à concentração de biossurfactante em solução, até que se atinja o valor de concentração micelar crítica (CMC) (Li *et al.*, 2009).

Trabalhos relacionados testaram a atividade de redução da tensão superficial de bactérias produtoras de biossurfactantes de solos contaminados com metais pesados e hidrocarbonetos, e solos sem perturbações antrópicas. O sobrenadante da cultura do isolado HAZ2 reduziu a tensão de 72 mN.m^{-1} (água) para $39,2 \pm 0,4 \text{ mN.m}^{-1}$, sendo o biossurfactante considerado pelos autores como “moderadamente ativo” (Bodour *et al.*, 2003). O sobrenadante da cultura de outro isolado (GA1-5) descrito pelos autores reduziu a tensão superficial para somente $49,4 \pm 0,5 \text{ mN.m}^{-1}$, sendo o biossurfactante produzido por esse isolado classificado como “minimamente ativo”.

Rhodococcus sp. cepa TA6, isolada de solo contaminado com petróleo, produz moléculas surfactantes capazes de reduzir a tensão superficial do meio de cultura de 68 para 30 mN.m^{-1} , após 48 h de incubação. O biossurfactante TA6 manteve estabilidade em solução com concentração de até 100 g.L^{-1} de cloreto de sódio (Shavandi *et al.*, 2011).

A bactéria *Alcaligenes faecalis*, isolada de solo contaminado com petróleo bruto, produz biossurfactantes capazes de reduzir a tensão superficial do meio de cultivo de $71,6 \text{ mN.m}^{-1}$ para $32,5 \pm 0,2 \text{ mN.m}^{-1}$ a 10 g.L^{-1} de NaCl. Na presença de 60 g.L^{-1} de NaCl, a TS aumentou para $39,8 \pm 0,93 \text{ mN.m}^{-1}$ (Bharali *et al.* 2011),

demonstrando a baixa estabilidade das moléculas de biossurfactantes na presença de sal.

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* designada WH-2, isolada de amostras de solo contaminado com gasolina, produziu compostos surfactantes capazes de reduzir a tensão superficial de valores próximos a da tensão da água (72 mN.m^{-1}) para 35 mN.m^{-1} , em concentração salina de 50 g.L^{-1} (Sharma *et al.* 2009).

Comparativamente aos resultados dos trabalhos citados acima, os biossurfactantes produzidos pelos 14 isolados dos solos da Ilha da Trindade demonstraram maior atividade (menores valores de tensão superficial) e maior tolerância ao NaCl (manutenção da atividade em concentrações de NaCl de até 175 g.L^{-1}). Destaca-se que não se fizeram, neste trabalho, mensurações de TS ou de TI em soluções com concentração salina acima de 175 g.L^{-1} . É possível, portanto, que os biossurfactantes produzidos pelos isolados da Ilha da Trindade sejam capazes de manter atividade superficial e interfacial em soluções contendo concentrações mais elevadas de sal. Essa característica coloca esses isolados como candidatos com alto potencial para aplicações que exijam tolerância à salinidade, como a recuperação avançada de petróleo, biorremediação, limpeza de tanques de armazenamento de óleo, transporte de óleo, dentre outras.

Os isolados selecionados são pertencentes ao filo Firmicutes. Como característica, Firmicutes são comumente isolados de ambientes com estresse osmótico (Aislabie *et al.*, 2008), condição similar à dos ambientes amostrados neste trabalho. A produção de esporos e cistos, alterações na membrana celular, acúmulo de solutos compatíveis e mecanismos diferenciados para reparação de material genético também têm sido relacionados à adaptação a condições de dessecação, altas osmolaridade e temperatura e pH's ácidos ou alcalinos-extremos (Potts, 1994; Mattimore e Battista 1996).

Na identificação dos isolados com base em análises dos perfis de ésteres metílicos de ácidos graxos, foram realizadas análises de agrupamento que serviram para avaliar se dentre os isolados analisados havia clones idênticos. Durante o isolamento são purificadas colônias com aparência similar. Estas colônias podem ou não serem clones de uma mesma cepa; questão esta que pode ser respondida com o dendrograma construído com base na Distância Euclidiana dos perfis de ácidos graxos.

Na identificação complementar à análise pelo sistema MIDI, os 14 isolados foram identificados com base na sequência parcial do gene rDNA 16S. Além dos valores de identidade dos isolados comparados às pertencentes ao banco de dados do NCBI, outro parâmetro utilizado nas análises foi o E-value (Expected Value), que confere maior confiabilidade às consultas à medida que o resultado se aproxima de zero. Esse valor corresponde à probabilidade de se obter alinhamento com sequência do banco de dados de forma aleatória (kerfeld e Scott, 2011). Valores de *E-value* que expressam baixa identidade (valores diferentes de zero) podem ser interpretados como: a espécie bacteriana não foi descrita ou seus dados ainda não constam no banco de dados (Velázquez et al. 2008).

Como observado nos resultados de identificação, houve uma discrepância na identificação entre os dois métodos utilizados, para os isolados TR 14 e TR 13. A identificação díspar entre os dois métodos pôde ser devida à ausência de *B. halotolerans* no banco de dados do sistema MIDI. O gênero *Brevibacterium* foi descrito por Breed em 1953, sendo *Brevibacterium linens* qualificada como espécie-tipo. São classificados como bastonetes gram-positivos e pertencentes à ordem dos Actinomycetales. Assim como Gammaproteobacteria, Deinococcus-Thermus, Actinobacterias e Bacteroidetes, são mais prevalentes em solos secos, sendo comum a bactérias desse grupo a presença de mecanismos de sobrevivência em condições severas (Saul et al., 2005). Bactérias do gênero *Brevibacterium* podem ser encontradas em uma ampla variedade de habitats, especialmente em ambientes com grande concentração de sal, sendo a maioria dos seus membros adaptados a se desenvolver bem na presença de 80 a 150 g L⁻¹ de NaCl (Sgroy et al. 2009). De acordo com a literatura, o gênero *Brevibacterium* já foi descrito como bactéria produtora de biossurfactante, porém ainda não há relatos sobre a espécie *B. halotolerans* produzindo tais compostos. Isoladas de solos contaminados com petróleo no sudeste da Argélia, bactérias pertencentes ao mesmo gênero produziram biossurfactantes ativos a 100 g.L⁻¹ de NaCl e com valores de tensão superficial nessa condição de 31,5 mN.m⁻¹. As moléculas tensoativas foram identificadas como glicolipídios e apresentaram eficácia antimicrobiana (Ferhat et al. 2011). De modo similar, *Brevibacterium aureum* foi isolada a partir de espumas do mar no sudeste da costa da Índia e demonstrou capacidade de produzir biossurfactantes ativos em soluções contendo 50 g.L⁻¹ de NaCl, sendo considerada

pelos autores como promissora no emprego em processos de recuperação avançada de petróleo em ambientes marinhos (Kiran *et al.*, 2010).

Esse resultado pode ser corroborado ainda pela semelhança de estabilidade do biossurfactante produzido por eles a uma concentração de 100 a 150 g.L⁻¹ de NaCl (Figura 3 e Tabela 6). A produção de exopolissacarídeos com propriedades tensoativas por células halofílicas de *Bacillus* B3-15 isolados de águas marinhas rasas em uma ilha vulcânica localizada na Itália foi reportada. Além da forte atividade surfactante comparada a outras moléculas, foi identificada também a atividade antimicrobiana do mesmo composto (Satpute *et al.* 2009). O gênero *Bacillus* tem sido relatado como produtor de uma grande variedade de lipopeptídios surfactantes, uma classe de biossurfactantes que inclui surfactina, iturina, fengicina e lichenisina. Além disso, *B. subtilis* é relatado como produtor de uma mistura composta por surfactina, iturina e fengicina, cada qual com diversas isoformas; *Bacillus licheniformis* é relatado como produtor de lichenisina, também com inúmeras isoformas, sendo esse gênero qualificado como um importante grupo de produtores de moléculas bioativas passíveis de inúmeras aplicações biotecnológicas (Bodour *et al.* 2003).

Bactérias produtoras de biossurfactantes são geralmente isoladas de ambientes contaminados com óleo ou derivados, sendo esses os principais locais utilizados como estratégia de prospecção desses organismos. Porém, esse habitat confere alta pressão seletiva, em decorrência da inibição condicionada pelos contaminantes, reduzindo assim a biodiversidade e conseqüentemente a complexidade metabólica presente, diminuindo com isso a probabilidade de prospecção de moléculas diferenciadas. Kiran *et al.* (2010) realizaram triagem de bactérias produtoras de biossurfactantes em ambientes marinhos sem histórico de contaminação por petróleo com êxito. Além disso, grande percentual de isolados produtores de biossurfactantes prospectados de solos não-contaminados, em relação a solos contaminados com petróleo ou metais pesados, foi relatado (Bodour *et al.* 2003).

Os dados apresentados indicam que, assim como outros produtos naturais, a exemplo de antibióticos, existe uma grande diversidade microbiana de produtores de biossurfactantes, sugerindo que a produção desses compostos é uma importante

ferramenta de sobrevivência em ambientes onde ocorra grande competição por recursos (Kiran *et al.* 2010).

5. CONCLUSÕES

-Foram isoladas cepas de *Bacillus subtilis* e *Brevibacterium halotolerans* do solo da Ilha da Trindade, com produção de biossurfactante ativos em concentrações elevadas de salinidade.

-Os biossurfactantes produzidos pelos isolados identificados como *Bacillus subtilis* possuem pequenas diferenças em sua atividade, podendo ser empregados em diferentes aplicações industriais e biotecnológicas.

-As moléculas surfactantes dos isolados TR 13 e TR 14 identificados preliminarmente como *Brevibacterium halotolerans*, mostraram ser um potencial substituto para os surfactantes sintéticos frequentemente utilizados principalmente na indústria do petróleo, devido a sua excelente atividade em altas concentrações salinas (170 g L⁻¹).

-Trata-se da primeira identificação de *Brevibacterium halotolerans* como produtora de biossurfactante.

-Os processos de triagem utilizados neste estudo, por meio de técnicas de cultivo com meios seletivos, mostraram ser eficientes e de baixo custo.

-O isolamento de micro-organismos com capacidade de produção de biossurfactantes ativos em condições extremas foi realizado com êxito em ambiente natural isolado e pouco ou não antropizado, o que sugere que a competição entre organismos onde ocorra uma biodiversidade mais ampla, pode ser uma boa estratégia de seleção de moléculas de interesse com melhores desempenhos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, H.; HAMED, M. M.; LOTFABAD, T. B.; ZAHIRI, H. S.; SHARAFI, H.; MASOOMI, F.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; ORTIZ, A.; AMANLOU, M.; NOGHABI, K. A.: **Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant.** Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011.

AISSLABIE, J.M.; JORDAN S.; BARKER, G.M.: **Relation between soil classification and bacterial diversity in soils of the Ross Sea region, Antarctica.** Geoderma, v. 144, p. 9 – 20, 2008.

ALMEIDA, F.F.M. **Ilha de Trindade - Registro de vulcanismo cenozóico no Atlântico Sul.** In: Schobbenhaus, C.; Campos, D.A. ; Queiroz, E.T.; Winge, M.; Berbert-Born, M.L.C. (Edits.) Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil. 1. ed. Brasília: DNPM/CPRM - Comissão Brasileira de Sítios Geológicos e Paleobiológicos (SIGEP), v.01, p. 369-377, 2002. [Acessar em <http://www.unb.br/ig/sigep/sitio092/sitio092.pdf>]

AL-BATAYNEH, K. M.; JACOB, J. H.; HUSSEIN, E. I.: **Isolation and molecular identification of new thermophilic bacterial strain of *Geobacillus pallidus* and *Anoxybacillus flavithermus*.** International Journal of Integrative Biology, v. 11, n. 1, p. 39 - 43, 2011.

BANAT, I.M., MAKKAR, R.S. & CAMEOTRA, S.S. **Potential commercial applications of microbial surfactants.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 53, p. 495-508, 2000.

BANAT I. M.: **Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation.** Bioresour. Technol. review, V.51, p. 1 - 12, 1995.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; MARÓSTICA JR., M. R.; PASTORE, G. M.: **Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos**. Química Nova, 30 (2), p. 409-414, 2007.

BHARALI P.; DAS S.; KONWAR B.K.; THAKUR A.J.: **Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: Feasibility in petro-spill bioremediation**. International Biodeterioration & Biodegradation v.65, p. 682 - 690, 2011.

BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A.: **Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock**. Antonie Van Leeuwenhock, v. 85, p. 1-8, 2004.

BEZERRA, M. S.: **Levantamento e avaliação de critérios para ampliação de escala da produção de biossurfactantes utilizando melão como substrato**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2006.

BODOUR, A. A.; DREES, K. P.; MAIER, R. M.: **Distribution of Biosurfactant-Producing Bacteria in Undisturbed and Contaminated Arid Southwestern Soils**. Applied and environmental microbiology, v. 69, n. 1, p. 3280 – 3287, 2003.

BOGNOLO, G. **Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons**. Colloids and Surface, v. 12, p. 41. 1999.

BONIEK D.; FIGUEIREDO D., PYRLO V. S.; DUARTE G. F.: **Characterization of bacterial strains capable of desulphurisation in soil and sediment samples from Antarctica**. Extremophiles, v. 14, p. 475 – 481, 2010.

BUYER, J. S.: **Improved fast gás chromatography for FAME analysi of bacteria**. Journal of Microbiology Methods, v. 54, n. 1, p. 117 – 120, 2003.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S.: **Synthesis of biosurfactants in extreme conditions**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 50, p. 520-529, 1998.

CARILLO, C.; TERUEL, J. A.; ARANDA, F.J.; ORTIZ, A. **Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin.** *Biochimica and Biophysica Acta*, 1611, p. 91-97.2003.

CIRIGLIANO, M.C.; GARMAN, G.M.: **Isolation of a bioemulsifier from *Candida*.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 48, p. 747-750, 1984.

CHEN, C. Y.; BAKER, S. C.; RICHARD, C. DARTON, R. C.: **The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources.** *Journal of Microbiological Methods*, v. 70, p. 503–510, 2007.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I.B. **Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation.** *Journal of Applied Microbiology*, 93, p.915-929, 2002.

CLEMENTE, E. P.; SCHAEFER, C. E. G. R.; OLIVEIRA, F. S.; ALBUQUERQUE, FILHO M. R.; ALVES, R. V.; SÁ, M. M. F.; MELO, V. F.; CORRÊA, G. R.: **Topossequência de solos na ilha da Trindade, Atlântico Sul.** *Revista Brasileira de Ciências do Solo* v. 33, p. 1357 - 1371, 2009.

COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E; GERSON, D. F.: **Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 37, p. 4 – 10, 1980.

DAS, K.; MUKHERJEE, A.K.: **Crude petroleum-oil bio-degradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum oil contaminated soil from North-East India.** *Bioresource Technology*, v. 98, p. 1339 – 1345, 2007.

DAS, P., MUKHERJEE, S., SEN, R.: **Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*.** *J. Appl. Microbiol.* 104, 1675–1684, 2008.

FERHAT, S.; MNIF, S.; BADIS, A.; EDDOUAOUA, K.; ALOUAOUI, R.; BOUCHERIT, A.; MHIRI, N.; MOULAI-MOSTEFA, N.; SAYADI, S.: **Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum sp. 1C* and *Brevibacterium sp. 7G* isolated from hydrocarbon-contaminated soils.** International Biodeterioration & Biodegradation, v. 65, p. 1182 – 1188, 2011.

FERNANDES, P. L.: **Biossurfactantes e polímeros de *Bacillus subtilis* ri4914 e sua aplicação em recuperação avançada de petróleo.** Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, UFV, Viçosa, 2011.

FERRAREZZO, E. M.: 1998. **Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de bioemulsificantes a partir de efluentes de indústria de margarina e sabão.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP, 1998.

GANS, J.; WOLINSKY, M.; DUNBAR, J.: **Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil.** Science v. 309, p. 1387-1390, 2005.

GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K.: **Microbial Surfactants: A Review.** Journal of Oleo Science, v. 55, p. 155-166, 2006.

GUDIÑA, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R.: **Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 76, p. 298 – 304, 2010.

GUYTON, ATHUR C.; HALL, JOHN E. - **Tratado de Fisiologia Médica - 10ª edição** - Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002, p. 408.

HALL, L.; DOERR, K. A.; WOHLFIEL, S. L.; ROBERTS, G. D.: **Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory.** J. Clin. Microbiol., v. 41, p. 1447 – 1453, 2003.

HOLMBERG, K. : **Natural surfactants**. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 6, 148- 159, 2001.

HOMMEL, R.K.; STEGNER, S.; KLEBER, H.P.; WEBER, L.: **Effect of ammonium ions on glycolipid production by *Candida (torulopsis) apicola***. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 42, p. 192-197, 1994.

HUDAK, A. J.; CASSIDY, D. P.: **Stimulating In-Soil Rhamnolipid Production in a Bioslurry Reactor by Limiting Nitrogen**. Biotechnology and Bioengineering, v. 88, n. 7, p.861- 868, 2004.

JOHNSON, M.; BOESE-MARRAZZO, D.: **Production and properties of heat stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa***. Infection and Immunity, v. 29, p. 1028 – 1033, 1980.

KERFELD, C. A.; SCOTT, K. M.: **Using BLAST to Teach “e-value-tionary” Concepts**. PLoS Biology, v. 9, n. 2, p. 1 - 4, 2011.

KIRAN, G. S.; THOMAS, T. A.; SELVIN, J.; SABARATHNAM, B.; LIPTON, A.P.: **Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture**. Bioresource Technology, v. 101, p. 2389 – 2396, 2010.

KUNITSKY, C.; OSTERHOUT, G.; SASSER, M.: **Identification of microorganisms using fatty acid methyl ester (fame) analysis and the midi sherlock[®] microbial identification system**. In: Miller M. J. Encyclopedia of rapid microbiological methods, Hardcover, v. 3, 480 páginas, 2006.

LANG, S.: **Biological amphiphiles (microbial biosurfactants)**. Current Opinion in Colloid and Interface Science, v. 7, p. 12–20, 2002.

LI, Y., QIANG, R. E MU, B.: **Influence of sodium ions on micelles of surfactin-C16 in solution.** Journal of Surfactants and Detergents v. 12, p. 31-36, 2009.

LIMA, TÂNIA M.S. ; PROCÓPIO, LORENA C. ; BRANDÃO, FELIPE D. ; LEÃO, BRUNA A. ; TÓTOLA, MARCOS R. ; BORGES, ARNALDO C.: **Evaluation of bacterial surfactant toxicity towards petroleum degrading microorganisms.** Bioresource Technology, v. 102, p. 2957-2964, 2011,a.

LIMA, TÂNIA M. S. ; PROCÓPIO, LORENA C. ; BRANDÃO, FELIPE D. ; CARVALHO, ANDRÉ M. X. ; TÓTOLA, MARCOS R. ; BORGES, ARNALDO C.: **Biodegradability of bacterial surfactants.** Biodegradation (Dordrecht), v. 22, p. 585-592, 2011b.

LIMA, TÂNIA M. S. ; PROCÓPIO, LORENA C. ; BRANDÃO, FELIPE D. ; CARVALHO, ANDRÉ M. X. ; TÓTOLA, MARCOS R. ; BORGES, ARNALDO C. ; LIMA, TÂNIA M.S.: **Simultaneous phenanthrene and cadmium removal from contaminated soil by a ligand/biosurfactant solution.** Biodegradation (Dordrecht), v. 22, p. 1007-1015, 2011c.

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

MANEERAT, S.; NITODA, T.; KANZAK, H.; KAWAI, F.: 2005. **Bile acids are new products of a marine bacterium, Myroides sp. strain SM1.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 67, 699–683, 2005.

MATTIMORE, V., BATTISTA, J.R.: **Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionising radiation are also necessary to survive prolonged desiccation.** J. Bacteriol., v. 178, p. 633 – 637, 1996.

MCINERNEY, M. J.; NAGLE, D. P.; KNAPP, R. M.: **Microbially enhanced oil recovery: past, present, and future.** In: M. Magot and B. Ollivier, Petroleum

Microbiology, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C. pp. 215-237, 2004.

MORAN, A.; MARTINES, A.; SINERIZ, F.: **Quantification of surfactin in culture supernatant by hemolytic activity.** Biotechnology Letters, v. 24, p. 177 – 180, 2002.

MORITA, T.; KONISHI, M.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, H. K.; KITAMOTO, D.: **Characterization of the genus *Pseudozyma* by the formation of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids.** FEMS Yeast Res., v. 7, p. 286 -292, 2007.

MOORE E., ARNSCHEIDT A., KRÜGER A., STRÖMPL C., MAU M.: **Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures.** Molecular Microbial Ecology Manual, Second Edition; v. 1.01, p. 3 - 18, 2004.

MULLIGAN, C. N. **Environmental applications for biosurfactants.** Environmental Pollution, v. 133, p. 183–198, 2005.

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F.: **Factors influencing the economics of biosurfactants.** In: **Biosurfactants: production, properties, applications.** KOSARIC, N. ed., Marcel Decker Inc., New York, p. 392 - 371, 1993.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; KOCHUPAPPY, T.; SIVACHIDAMBARAM, P.: **Biosurfactants: Properties, commercial production and application.** Current Science, v. 94, N. 6, 2008.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. **Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações.** Química Nova, v. 25, nº 5, p. 772-776, 2002.

PARREIRA, A. G. ; TÓTOLA, M. R.: **Microbial Biodegradation of Aromatic Compounds in a Soil Contaminated with Gasohol.** British Biotechnology Journal, v. 1, p. 33-38, 2011.

POTTS, M.: **Desiccation tolerance of prokaryotes**. Micro Rev. v. 58, p. 755 – 805, 1994.

PRUTHI V.; CAMEOTRA S. S.: **Rapid identification of biosurfactant producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique**. Biotechnology Techniques, Vol 11, No 9, September 1997, pp. 671–674, 1997.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E.: **Biosurfactants and Oil Bioremediation**. Current Opinion in Biotechnology, v. 13, p. 249 - 252, 2002.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; BANAT, I. M.: **Ocurrence of Crude Oil Degrading Bacteria in Gasoline and Diesel Station Soil**. Journal Basic of Microbiology, v. 42, p. 284 - 291, 2002.

ROMERO, D.; PÉREZ-GARCÍA, A.; VEENING, J. W.; VICENTE, A.; KUIPERS O. P.: **Transformation of undomesticated strains of Bacillus subtilis by protoplast electroporation**. Journal of Microbiological Methods, v. 66, p. 556–559, 2006.

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

SATPUTE, S. K.; BANAT, I. M.; DHAKEPHALKAR ,P. K.; BANPURKAR, A. G.; CHOPADE, B. A.: **Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms**. Biotechnology Advances, v. 28, p. 436 – 450, 2010.

SAUL, D.J., AISLABIE, J.M., BROWN, C.E., HARRIS, L., FOGHT, J.M.: **Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica**. FEMS Microbiol. Ecol. 53, 141 – 155, 2005.

SGROY, V.; CASSÁN, F.; MASCIARELLI, O.; FLORENCIA, M.; PAPA, D.; LAGARES ,A.: **Virginia Luna Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria**

associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. Appl Microbiol Biotechnol, Springer-Verlag, 2009.

SHARMA, S.; SINGH, P.; RAJ, M.; CHADHA, B. S.; SAINI, H. S.: **Aqueous phase partitioning of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers by biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* WH-2**. Journal of Hazardous Materials, v. 171, p. 1178 – 1182, 2009.

SHARMA, M. K.; SHAH, D.O.: **Use of surfactants in oil recovery**, p. 253 - 315. In Donaldson E. C.; Chilingarian G. V.: **Enhanced oil recovery II process and operations**. The Fu Yen (ed), Elsevier, New York, 1989.

SHAVANDI, M.; MOHEBALI, G.; HADDADI, A.; SHAKARAMI, H.; NUHI, A.: **Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant - producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 82, p. 477 – 482, 2011.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; AND WARD, O. P.: **Surfactants in microbiology and biotechnology**: part 2. Application aspects, Biotechnol. Adv., v. 25, p. 99 -121, 2007.

STACKEBRANDT, E.; EBERS, J.: **“Taxonomic parameters re-visited: tarnished gold standards”** Microbiology Today, v.33, n. 4, p. 152 - 155, 2006.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S.: **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0**. Molecular Biology and Evolution, v.24, n. 8, p.1596-1599, 2007.

UCHIDA, Y.; TSUCHIYA, R.; CHINO, M.; HIRANO, J.; TABUCHI, T.: **Extracellular accumulation of mono- and di-succinoyl trehalose lipids by a strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes**. Agricultural and Biological Chemistry, v. 53, p. 757-763, 1989.

VATER, J.; KABLITZ, B.; WILDE, C.; FRANKE, P.; MEHTA, N.; CAMEOTRA, S.S.: **Matrixassisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge.** Applied and Environmental Microbiology, v. 68, p. 6210-6219, 2002.

VELÁZQUEZ, E.; ROJAS, M.; LORITE, M. J.; RIVAS, R.; ZURDO-PIÑEIRO, J. L.; HEYDRICH, M.; BEDMAR, E. J. **Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of the medullary parenchyma of the stem of healthy sugarcane plants.** Journal of Basic Microbiology, v. 48, n. 2, p. 118 - 124, 2008.

YONEBAYASHI, H.; YOSHIDA, S.; ONO, K.; ENOMOTO, H.: **Screening of microorganisms for microbial enhanced oil recovery process.** Sekiyu Gakkaishi, v. 43, p. 59 – 69, 2000.

YOUSSEF, N.; SIMPSON, N.; DUNCAN, D.; MCINERNEY, K.; FOLMSBEE, M.; FINCHER, M.; KNAPP, R.: **In Situ Biosurfactant Production by *Bacillus* Strains Injected into a Limestone Petroleum Reservoir.** Applied and Environmental Microbiology, v. 73, p. 1239 -1247, 2007.

YOUSSEF, N. H., K. E., DUNCAN, D. P., NAGLE, K. N., SAVAGE, R. M., KNAPP M. J. MCINERNEY.: 2004. **Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms.** J. Microbiol. Methods, v. 56: p. 339–347, 2004.

ZWOLINSKI, M.D. **DNA Sequencing: Strategies for Soil Microbiology.** Soil Science Society of America Journal v. 71, p. 592–600, 2007.