

BRUNA ALMEIDA LEÃO AYUPE

**CONTROLE DA BACTÉRIA REDUTORA DE SULFATO
Desulfovibrio alaskensis POR UM BIOSSURFACTANTE
LIPOPEPTÍDEO PRODUZIDO POR *Bacillus subtilis* TR47II**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

A989c
2017 Ayupe, Bruna Almeida Leão, 1982-
Controle da bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio alaskensis* por um biossurfactante lipopeptídico produzido por *Bacillus subtilis* TR47II / Bruna Almeida Leão Ayupe. – Viçosa, MG, 2017.

xi, 86f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Marcos Rogério Tótola.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Bactérias. 2. Agentes ativos de superfície.
3. Hidrocarbonetos. 4. *Bacillus subtilis*. 5. *Desulfovibrio alaskensis*. 6. Atividade antimicrobiana. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22 ed. 579.3

BRUNA ALMEIDA LEÃO AYUPE

**CONTROLE DA BACTÉRIA REDUTORA DE SULFATO
Desulfovibrio alaskensis POR UM BIOSSURFACTANTE
LIPOPEPTÍDEO PRODUZIDO POR *Bacillus subtilis* TR47II**

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

APROVADA: 06 de julho de 2017.

Célia Alencar de Moraes

Wendel Batista da Silveira

Péricles Leonardo Fernandes

Edvaldo Barros

Marcos Rogério Tótola
(Orientador)

“Ninguém vence sozinho, nem no campo, nem na vida!”

Papa Francisco

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Ele nada disso seria possível.

Ao paizinho e à mãezinha, pelos mais valiosos ensinamentos! Pelo amor, que desde o princípio, me impulsiona a seguir em frente e a não desistir de lutar.

Ao meu amado esposo Tiago, pela compreensão nos momentos de cansaço e ausência, por me incentivar e estar sempre ao meu lado.

Às minhas irmãs Sabrina e Cinthia, minhas grandes amigas, pelo apoio constante e pelos conselhos em todos os momentos da minha vida.

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

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

Ao meu orientador, Marcos Rogério Tótola, pelo conhecimento compartilhado, pelo apoio na execução deste trabalho, pelo incentivo e pela confiança.

Aos meus coorientadores, Cynthia Canêdo da Silva, Vanessa de Freitas Cunha Lins, Hilário Cuquetto Mantovani e Paulo Roberto Cecon, pela disponibilidade em ajudar sempre que solicitados.

A todos os colegas e amigos do LBBMA, Fernanda, Péricles, Gustavo, Max, Edmo, Michelle, Léo, Marcela, Karlos, Tati, Bruna, Mateus, Sílvia, Tiago, Luana, Flora, Isabella, Nathalia, Pedro, João, João Vítor, Adriana, Brauly, pelo ambiente agradável de trabalho, pela amizade, pelos incentivos e por todo apoio durante esse período. Ao Pedro, pela ajuda nos experimentos e pela oportunidade de aprender a ensinar.

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas, por disponibilizar o equipamento MALDI-TOF/TOF e às agências de fomento CAPES, FINEP, CNPq e FAPEMIG pela disponibilidade de recursos para a manutenção do mesmo. Ao Edvaldo, pela grande ajuda nas análises dos espectros de massas.

Ao Centro de Pesquisas Leopoldo Américo Miguez de Mello (Cenpes-Petrobras) pelo fornecimento da bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio alaskensis* NCIMB 13491.

A todos do projeto de extensão “BIOLIBRAS: ressignificando a iniciação ao ensino de Ciências no contexto de estudantes surdos do município de Viçosa,

MG”, pela agradável convivência e pela grande oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

A todos da Casa da Música, pelos momentos de descontração e pelo incentivo na descoberta de um novo dom, o qual me ajudou a manter a calma e o bom humor em muitos momentos desta etapa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, e aos meus familiares e amigos que ficaram na torcida, de longe, para que tudo terminasse bem, o meu muito obrigada!

BIOGRAFIA

BRUNA ALMEIDA LEÃO AYUPE, filha de Oswaldo Silva de Almeida e Rosemeire Ribeiro de Almeida, nasceu em Governador Valadares, Minas Gerais, no dia 03 de julho de 1982.

Em março de 2007 graduou-se em Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Em julho de 2009 tornou-se mestre em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, na área de microbiologia de petróleo com ênfase em inibição de bactéria redutora de sulfato.

Durante dois anos, de 2010 a 2012, atuou como analista de laboratório na empresa AgroGenética – Laboratório de Análises Genéticas, em Viçosa, MG.

Em março de 2013 iniciou o curso de especialização em Gestão Empresarial e Ambiental, pela Universidade Federal de Viçosa, o qual concluiu em 2015.

Em março de 2013 iniciou o doutorado em Microbiologia Agrícola na mesma Universidade, na área de microbiologia de petróleo.

SUMÁRIO

Resumo.....	viii
Abstract	x
Introdução Geral.....	1
Capítulo 1	4
Revisão Bibliográfica.....	4
1.1. Introdução	5
1.2. Souring biogênico	6
1.3. Bactérias redutoras de sulfato	9
1.4. Principais formas de controle do souring biogênico.....	11
1.4.1. Remoção de sulfato	11
1.4.2. Biocidas	11
1.4.3. Nitrato e nitrito	11
1.4.4. Molibdato	12
1.4.5. Biossurfactantes – moléculas promissoras	12
1.5. Referências.....	17
Capítulo 2	21
Ação antimicrobiana de <i>Bacillus subtilis</i> isolados da Ilha da Trindade contra bactéria redutora de sulfato	21
Resumo	22
2.1. Introdução	23
2.2.1. Microrganismos e condições de cultivo	24
2.2.2 Produção dos biossurfactantes.....	26
2.2.3. Obtenção dos extratos brutos de biossurfactantes.....	27
2.2.4. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos de biossurfactantes	27
2.2.5. Extração em soxhlet e purificação do biossurfactante de <i>B. subtilis</i> TR47II	28
2.2.6. Investigação da fração ativa do extrato do soxhlet.....	28
2.2.7. Termoestabilidade do extrato bruto de TR47II	29
2.2.8. Extração independente do soxhlet.....	30
2.2.9. Ação antimicrobiana do extrato metanólico.....	30
2.2.10. Bioautografia do extrato bruto e extrato metanólico.....	30
2.3. Resultados.....	31
2.3.1. Ação antimicrobiana dos extratos brutos de biossurfactantes.....	31
2.3.2. Purificação do extrato do soxhlet.....	33

2.3.3. Investigação da fração ativa do extrato obtido com uso do soxhlet.....	34
2.3.4. Termoestabilidade do extrato bruto de <i>B. subtilis</i> TR47II	35
2.3.5. Extração independente do soxhlet.....	36
2.3.6. Bioautografia do extrato bruto e extrato metanólico.....	37
2.4. Discussão	38
2.5. Conclusões	42
2.6. Referências.....	43
Capítulo 3	47
Coprodução de lipopeptídeos por <i>Bacillus subtilis</i> TR47II e ação antimicrobiana contra a bactéria redutora de sulfato <i>Desulfovibrio alaskensis</i>	47
Resumo.....	48
3.1. Introdução	49
3.2. Materiais e métodos	51
3.2.1. Microrganismos e condições de cultivo	51
3.2.2. Crescimento e produção de biossurfactantes por <i>B. subtilis</i> TR47II ...	51
3.2.3. Obtenção do extrato bruto dos biossurfactantes de <i>B. subtilis</i> TR47II	52
3.2.4. Extração e purificação dos biossurfactantes produzidos por <i>B. subtilis</i> TR47II	52
3.2.5. Espectrometria de massas por ionização/dessorção a laser assistida por matriz com análise do tempo de voo (MALDI-TOF/TOF-MS e -MS/MS)...	53
3.2.6. Investigação da fração ativa e determinação da concentração mínima inibitória (CMI)	54
3.2.7. Bioautografia das frações purificadas	55
3.3. Resultados	56
3.3.1. Crescimento e produção de biossurfactantes por <i>B. subtilis</i> TR47II ...	56
3.3.2. Purificação do extrato metanólico	58
3.3.3. Investigação da fração ativa e concentração mínima inibitória	59
3.3.4. Bioautografia	60
3.3.5. MALDI-TOF/TOF-MS das frações F2 e F3	61
3.3.6. MALDI-TOF/TOF-MS/MS das frações F2 e F3	63
3.4. Discussão	79
3.5. Conclusões	81
3.6. Referências	82
Conclusões Gerais	85

RESUMO

AYUPE, Bruna Almeida Leão, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Controle da bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio alaskensis* por um biossurfactante lipopeptídeo produzido por *Bacillus subtilis* TR47II.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Coorientadores: Cynthia Canêdo da Silva, Vanessa de Freitas Cunha Lins, Hilário Cuquetto Mantovani e Paulo Roberto Cecon.

Este estudo é iniciado com uma revisão bibliográfica que aborda o problema gerado pela produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) por bactérias redutoras de sulfato (BRS) na indústria do petróleo. Nessa revisão são apresentados aspectos relacionados à causa desse problema, às consequências e principais formas de controle. Na parte experimental do nosso estudo, nós investigamos a ação antimicrobiana de extratos brutos contendo biossurfactantes obtidos de oito isolados de *Bacillus* sp. contra *Desulfovibrio alaskensis* NCIMB 13491, uma BRS isolada de reservatório de petróleo com produção de H₂S na Baía de Purdu, Alasca. Os extratos brutos contendo biossurfactantes produzidos por *B. subtilis* TR12, *B. subtilis* TR22, *B. subtilis* TR35II e *B. subtilis* TR47II, todos isolados de solo da ilha oceânica da Trindade, apresentaram ação antimicrobiana contra *D. alaskensis*. *B. subtilis* TR47II, por apresentar maior efeito antimicrobiano, foi selecionado para investigação da molécula ativa presente no extrato bruto. A avaliação da ação antimicrobiana por bioautografia revelou que o extrato bruto continha uma fração ativa com fator de retenção (R_f) semelhante ao padrão comercial do lipopeptídeo iturina. Essa observação incentivou uma nova investigação do estudo, uma vez que, no nosso conhecimento, não há relatos sobre a ação de iturinas contra BRS. Nosso objetivo seguinte foi purificar a fração ativa do extrato bruto de *B. subtilis* TR47II por cromatografia em coluna de sílica gel e caracterizá-la quimicamente por espectrometria de massas por ionização/dessorção a laser assistida por matriz com análise do tempo de voo (MALDI-TOF/TOF-MS e MS/MS). A fração ativa mostrou picos em *m/z* correspondentes a prováveis lipopeptídeos da família das iturinas (*m/z* 1043 e 1057) e das fengicinas (*m/z* 1463). Além disso, os picos em *m/z* 1030, 1044, 1058 e 1072, na fração não-ativa do extrato de *B. subtilis* TR47II, foram identificados como homólogos de surfactinas com a sequência peptídica Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu e variação na cadeia lateral em C₁₃, C₁₄, C₁₅ e C₁₆ β-hidroxi ácido graxo,

respectivamente. Como conclusões, nosso trabalho relata, pela primeira vez, a ação antimicrobiana contra BRS de extratos brutos contendo biossurfactantes obtidos de bactérias isoladas da Ilha da Trindade. Esse ainda é o primeiro relato sugerindo um provável lipopeptídeo iturina com ação antimicrobiana contra BRS. Os resultados obtidos neste trabalho abrem a oportunidade de descoberta de novas moléculas ativas que possam ser aplicadas no setor industrial, particularmente na indústria do petróleo.

ABSTRACT

AYUPE, Bruna Almeida Leão, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Control of the sulfate reducing bacteria *Desulfovibrio alaskensis* by a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* TR47II.** Adviser: Marcos Rogério Tótola. Co-advisers: Cynthia Canedo da Silva, Vanessa de Freitas Cunha Lins, Hilário Cuquetto Mantovani and Paulo Roberto Cecon.

This study starts with a literature review approach the problem generated by the production of hydrogen sulphide by sulfate reducing bacteria (SRB) in the petroleum industry. This review presents aspects related to the cause of this problem, the consequence and main forms of control. In the experimental part of our study, we investigated the antimicrobial action of crude extracts containing biosurfactants obtained from eight isolates of *Bacillus* sp. against SRB *Desulfovibrio alaskensis* NCIMB 13491, a SRB isolated from a souring oil reservoir in Purdu Bay, Alaska. The crude extracts containing biosurfactants produced by *B. subtilis* TR12, *B. subtilis* TR22, *B. subtilis* TR35II and *B. subtilis* TR47II, all isolated from the soil of the oceanic Trindade Island, showed action against *D. alaskensis*. *B. subtilis* TR47II, due to its higher antimicrobial effect, was selected for investigation of the active molecule present in the crude extract. The evaluation of the antimicrobial action by bioautography revealed that the crude extract contained an active fraction with a retention factor (R_f) similar to the commercially available lipopeptide iturin. This observation encouraged a new investigation of the study, since, to our knowledge, there are no reports on the action of iturin against SRB. Our next objective was to purify the active fraction of the crude extract of *B. subtilis* TR47II purify by thin layer chromatography and to characterize it chemically by matrix-assisted laser desorption ionization with time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF-MS and MS/MS). The active fraction showed peaks with m/z corresponding to probable lipopeptides of the iturin family (m/z 1043 and 1057) and fengycin (m/z 1463). In addition, the peaks with m/z 1030, 1044, 1058 and 1072 in the non-active fraction of the crude extract of *B. subtilis* TR47II, were identified as surfactin homologs with the peptide sequence Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu and variation in the side chain in C₁₃, C₁₄, C₁₅ and C₁₆ β -hydroxy fatty acid, respectively. In conclusion, our work reports, for the first time, the antimicrobial action against SRB of crude extracts

containing biosurfactants obtained from bacteria isolated of Trindade Island. This is still the first report suggesting a probable lipopeptide iturin with antimicrobial action against SRB. The results obtained in this work open the opportunity to discover new active molecules that can be applied in the industrial sector, particularly in the oil industry.

Introdução Geral

Introdução Geral

A produção de sulfeto de hidrogênio por bactérias redutoras de sulfato (BRS) é considerado um dos principais problemas na indústria do petróleo. O *souring* biogênico, como é conhecido esse processo, impacta negativamente esse setor de diversas maneiras. O H₂S é um gás altamente tóxico, corrosivo e inflamável, o que gera problemas de segurança e risco à saúde dos trabalhadores. Além disso, o H₂S diminui a qualidade do petróleo em decorrência do alto conteúdo de enxofre associado ao mesmo e pode provocar entupimento dos reservatórios devido à precipitação de sulfeto de ferro e como consequência, aumenta os custos de produção do petróleo.

Estratégias para controlar o crescimento de BRS incluem principalmente o uso de biocidas como glutaraldeído, formaldeído, compostos de amônia quaternária e sulfato de tetrakis hidroximetil fosfônio (THPS). Em operações a campo, altas doses de biocidas são empregadas por longos períodos, o que pode levar à seleção de microrganismos resistentes bem como riscos à saúde humana e ao meio ambiente.

Moléculas tensoativas biológicas ou biossurfactantes inibem o crescimento de vários microrganismos e são uma possível alternativa para o controle de BRS. Além disso, os biossurfactantes apresentam alta biodegradabilidade e baixa toxicidade ambiental, características essenciais para aplicação biocida na indústria do petróleo. Biossurfactantes produzidos por bactérias do gênero *Bacillus* são reconhecidos como agentes antimicrobianos bastante eficientes contra uma diversidade de microrganismos. Essas moléculas são ainda excelentes tensoativos, utilizados em processos de recuperação melhorada do petróleo, o que confere vantagem adicional como agente biocida na indústria do petróleo.

Recentemente, em parceria com o Programa de Pesquisas Científicas na Ilha da Trindade – PROTRINDADE, nosso grupo de pesquisas isolou bactérias produtoras de biossurfactantes do gênero *Bacillus* a partir de solo dessa ilha, o que permitiu investigações adicionais com esses isolados. Os objetivos propostos neste trabalho visam investigar a produção de substâncias antimicrobianas, particularmente biossurfactantes, por *Bacillus* sp., incluindo isolados da Ilha da Trindade, para aplicação no controle de BRS na indústria do petróleo.

O trabalho está organizado em três capítulos. No primeiro capítulo, “Revisão Bibliográfica”, é apresentada uma revisão bibliográfica sobre a produção de sulfeto de hidrogênio na indústria do petróleo, os fatores envolvidos com sua produção, as consequências para esse setor e principais formas de controle.

No capítulo 2, “Ação antimicrobiana de *Bacillus subtilis* isolados da Ilha da Trindade contra bactéria redutora de sulfato” é realizada uma investigação da ação antimicrobiana de extratos brutos contendo biossurfactantes obtidos de bactérias do gênero *Bacillus* contra a BRS *Desulfovibrio alaskensis*. Ensaio de termoestabilidade e bioautografia são apresentados para o extrato com maior ação antimicrobiana, o de *B. subtilis* TR47II.

No capítulo 3, “Coprodução de lipopeptídeos por *Bacillus subtilis* TR47II e ação antimicrobiana contra a bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio alaskensis*”, é apresentada a purificação e caracterização química, por espectrometria de massas, da fração ativa do extrato de *B. subtilis* TR47II.

Capítulo 1

Revisão Bibliográfica

Revisão Bibliográfica

1.1. Introdução

O fenômeno de *souring* em reservatórios de óleo cru é um problema antigo e reconhecido como uma das principais preocupações na indústria do petróleo. O termo *souring* refere-se à acidificação do petróleo, decorrente do aumento da concentração de compostos de enxofre, principalmente sulfeto de hidrogênio (H_2S) na fase gasosa, oleosa e aquosa dos fluidos produzidos na indústria do petróleo (Elmawgoud *et al.*, 2015). Um dos principais processos a contribuir com o *souring* é a geração de H_2S por microrganismos redutores de sulfato (Gieg *et al.*, 2011).

A concentração de H_2S é geralmente medida em partes por milhão do volume na fase gasosa ($ppm\ v^{-1}$) em relação à partição óleo/água, em pH menor ou igual a 5,0 sob condições padrão de temperatura e pressão (20 °C e 1 atm) (Elmawgoud *et al.*, 2015). Quando a concentração de H_2S ultrapassa $10\ ppm\ v^{-1}$, o poço de petróleo é considerado acidificado por H_2S , e precauções são necessárias nas áreas de operação da produção, transporte e armazenamento em razão dos efeitos tóxicos e corrosivos do H_2S , formação de incrustações nos reservatórios e aumento do conteúdo de enxofre no petróleo, o que diminui sua qualidade (Elmawgoud *et al.*, 2015).

Mecanismos não-biogênicos podem influenciar no aumento da concentração de H_2S nos reservatórios, os quais incluem a decomposição termofílica de hidrocarbonetos contendo enxofre, a dissolução de pirita (FeS_2) e a redução termoquímica do sulfato (Gieg *et al.* 2011). Esses mecanismos são principalmente influenciados pelas características da rocha e temperatura do reservatório e pela composição do óleo (Vance e Thrasher, 2005). Por outro lado, o *souring* biogênico ocorre quando microrganismos reduzem compostos de enxofre como sulfato (SO_4^{2-}), tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$) ou enxofre elementar (S^0) a H_2S durante o crescimento (Muyzer e Stam, 2008; Johnson, *et al.* 2017).

A maioria dos microrganismos redutores de sulfato são bactérias, tipicamente Deltaproteobacteria e, por isso, esse grupo é geralmente denominado como “bactérias redutoras de sulfato”, ou simplesmente BRS (Muyzer e Stam, 2008). No entanto, alguns membros são filogeneticamente relacionados com Archaea, e são denominados “arqueas redutoras de sulfato” ou ARS (Gieg *et al.*,

2011). Alguns autores adotam uma terminologia mais abrangente, utilizando o termo “procariotos redutores de sulfato” (PRS) para se referenciar a microrganismos redutores de sulfato, independentemente da afiliação filogenética (Gieg *et al.*, 2011; Johnson, *et al.*, 2017). Apesar disso, o termo BRS tem sido comumente utilizado para fazer referência a membros de ambos os domínios (Birkeland *et al.*, 2005; Muyzer e Stam, 2008), e será utilizado nesta revisão.

O *souring* biogênico está principalmente associado ao processo de recuperação secundária do petróleo, o qual frequentemente envolve a injeção de água para manter a pressão interna do reservatório e aumentar a recuperação do petróleo (Vance e Thrasher, 2005). BRS presentes nos reservatórios podem utilizar o sulfato da água de injeção como acceptor de elétrons, levando ao aumento das concentrações de H₂S (Vance e Thrasher, 2005; Gieg *et al.*, 2011).

Estima-se um custo de 2 % do projeto total de instalação do sistema de injeção de água apenas para cobrir os gastos com os serviços de metalurgia que garantam a integridade do sistema em condições de alta produção de H₂S. Esse custo pode aumentar em até uma ordem de magnitude se o projeto precisar ser adaptado (Vance e Thrasher, 2005). Como muitos projetos excedem o valor de \$1 bilhão, esses custos podem ser bem significativos (Jonhson *et al.* 2017). Somente nos Estados Unidos, o custo anual da corrosão na indústria do petróleo é estimado em \$1,4 bilhões, e o *souring* nos reservatórios contribui para o aumento desse custo (Koch *et al.*, 2016, Jonhson *et al.* 2017).

1.2. *Souring* biogênico

Evidências iniciais da associação de BRS com o *souring* na indústria do petróleo datam de quase um século (Bastin *et al.*, 1926). Atualmente, é amplamente aceito que o *souring* biogênico é o mecanismo mais importante de produção de H₂S e é resultante da injeção de água no sistema de produção (Vance e Thrasher, 2005; Gieg *et al.*, 2011).

Durante o processo de extração do petróleo, três etapas clássicas são conhecidas: recuperação primária, secundária e terciária (Planckaert, 2005). A recuperação primária é direcionada pela própria pressão do reservatório. A recuperação secundária consiste de injeção de gás ou água para manter a pressão interna e aumentar a recuperação do petróleo. Em média, 15 a 60 % do petróleo podem ser recuperados por esse processo, dependendo das características do

mesmo, das do reservatório e do número e posição dos poços. Na recuperação terciária utilizam-se técnicas melhoradas envolvendo métodos térmicos, químicos e microbiológicos para diminuir a viscosidade do petróleo e aumentar a sua recuperação (Planckaert, 2005).

Na recuperação secundária, água do mar ou de outras fontes é frequentemente utilizada pra repressurizar o reservatório após perda da pressão natural, forçando o petróleo em direção ao poço produtor (Figura 1). BRS presentes no reservatório ou introduzidas pelo fluido de injeção, podem utilizar o sulfato da água injetada, levando ao aumento das concentrações de H₂S (Xu e Gu *et al.*, 2015).

A produção de H₂S pode se manifestar no próprio reservatório, resultando em perda de qualidade do óleo e do gás recuperados e pode ainda ocorrer nas instalações de processamento na superfície. Essas incluem unidades de separação óleo-água, tanques de armazenamento de água de produção (água recuperada junto com o óleo, a qual pode ser reinjetada no reservatório), e nas tubulações usadas para o transporte desses fluidos (Figura 1). Em reservatórios com temperaturas elevadas, acima de 100 °C, a produção de H₂S é principalmente observada nas instalações de superfície ou em regiões próximas ao local de injeção (região de influência), onde a água fria de injeção se mistura com o fluido quente e proporciona temperaturas mais adequadas para o crescimento de BRS (Gieg *et al.*, 2011).

Além de sulfato, a água de injeção pode conter fontes de carbono, micronutrientes e BRS viáveis, favorecendo a ocorrência do *souring* biogênico em operações no continente (*onshore*) ou em alto-mar (*offshore*). Portanto, a fonte da água de injeção desempenha um papel importante na extensão do *souring*, e sua escolha é principalmente baseada na disponibilidade e no custo (Gieg *et al.*, 2011). Por exemplo, em operações terrestres a água pode ser obtida do aquífero local ou fonte superficial como rios. Dada a limitação dessas fontes em alguns locais, a reinjeção da água de produção é uma prática comum (Planckaert, 2005; Gieg *et al.*, 2011). Já nas operações *offshore*, a água do mar é a mais utilizada, em decorrência da maior disponibilidade nesses locais. Em contrapartida, as altas concentrações de sulfato na água do mar (25 a 30 mmol L⁻¹), fornecem grandes quantidades de aceptores de elétrons para a atividade de

BRS (Vance e Thrasher, 2005; Gieg *et al.*, 2011). Considerando que grandes volumes de água do mar podem ser injetados em um poço, cerca de $10.000 \text{ m}^3 \text{ dia}^{-1}$, grandes quantidades de sulfeto biogênico podem ser produzidas (acima de $1.100 \text{ Kg dia}^{-1}$) (Hubert e Voordouw, 2007).

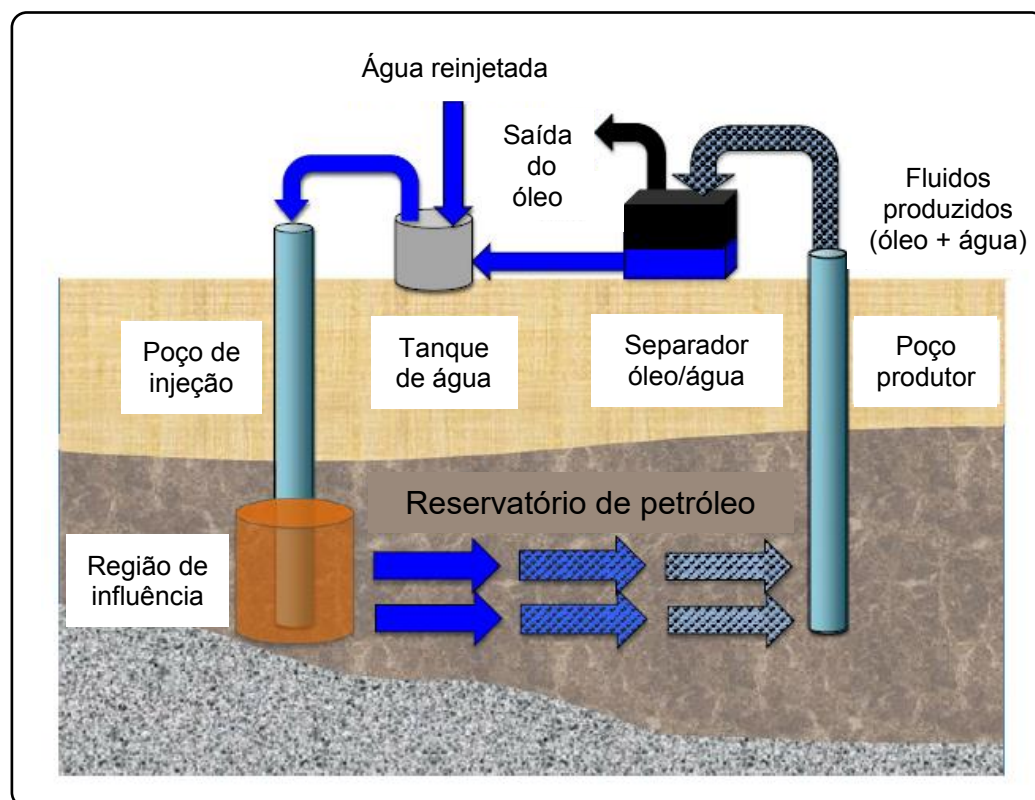


Figura 1. Esquema da reinjeção da “água produzida”, comumente utilizada na recuperação secundária em operações no continente (*onshore*). Fluidos a partir do poço produtor são separados em óleo, que é coletado e enviado para processamento, e água, que é reinjetada no reservatório pelo poço de injeção. A injeção de “água produzida” é menos comum em operações em alto-mar (*offshore*). A “região de influência” refere-se à área próxima ao poço de injeção que sofre maior influência química e biológica da água injetada. Nessa região, as altas temperaturas em poços *onshore* podem diminuir em decorrência do resfriamento provocado pela água de injeção, e onde a atividade microbiana pode ser muito maior do que no restante do reservatório. Adaptada de Gieg *et al.*, 2011.

A produção de sulfeto de hidrogênio impacta negativamente a indústria do petróleo de diversas maneiras. O H_2S é um gás altamente tóxico, corrosivo e inflamável, o que gera problemas de segurança e risco à saúde dos trabalhadores (Reiffenstein *et al.*, 1992, Tang *et al.*, 2009). O odor característico de “ovo podre” é perceptível em concentrações tão baixas quanto cerca de $0,005 \text{ ppm}$ e a exposição repetida e prolongada ao H_2S pode causar dores de cabeça, náuseas, irritação dos olhos, problemas respiratórios e, em situações mais graves, pode

levar à perda de consciência e até à morte (Reiffenstein *et al.*, 1992, Johnson *et al.*, 2017). Além disso, o sulfeto diminui a qualidade do petróleo, uma vez que aumenta a concentração de enxofre no óleo recuperado. Pode ainda provocar entupimento de reservatórios e tubulações de escoamento de óleo, o qual resulta de sua precipitação como sulfeto de ferro e, como consequência, aumenta os custos de produção do petróleo (Gieg *et al.*, 2011). Por fim, BRS podem formar biofilmes nas tubulações e tanques, o que também leva à diminuição do fluxo de petróleo nos dutos, elevando com isso os gastos de energia para bombeamento e o desgaste de equipamentos. Adicionalmente, maiores doses de biocidas são requeridas para se obter um controle satisfatório dos microrganismos, quando esses se encontram protegidos nas estruturas dos biofilmes (Xu e Gu *et al.*, 2015).

1.3. Bactérias redutoras de sulfato

BRS formam um grupo de procariotos anaeróbios com ampla variedade morfológica e metabólica. Utilizam compostos sulfurados inorgânicos, principalmente sulfato, como aceptor de elétrons na respiração anaeróbia e compostos orgânicos ou hidrogênio como doadores de elétrons, resultando na produção de sulfeto de hidrogênio (Birkeland, 2005; Muyzer e Stam, 2008). Esse processo é referido como redução dissimilativa de sulfato, o qual é restrito às BRS. Ao contrário, o processo de redução de sulfato por meio da via assimilativa produz compostos de enxofre reduzidos para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, e, portanto, não leva à excreção direta do sulfeto de hidrogênio (Tang *et al.*, 2009).

A redução do sulfato a H_2S inicia com a ativação do sulfato pela ação da enzima ATP sulfurilase, que catalisa a ligação de um íon sulfato a um fosfato do ATP, levando à formação de adenosina fosfosulfato (APS) (Figura 2). Na redução dissimilativa, o sulfato do APS é diretamente reduzido a sulfito (SO_3^{2-}) pela enzima APS redutase, com a liberação de adenosina monofosfato (AMP). Na redução assimilativa, outro fosfato é adicionado à APS, formando fosfoadenosina fosfosulfato (PAPS). PAPS é então reduzido a sulfito. Em ambas as vias, o primeiro produto da redução do sulfato é o sulfito. Uma vez que o sulfito é formado, ele é reduzido a sulfeto pela enzima sulfito redutase. Na redução dissimilativa, o sulfeto é excretado, enquanto na redução assimilativa o

sulfeto é incorporado para gerar compostos orgânicos sulfurados (Tang, *et al.*, 2009; Madigan *et al.*, 2010).

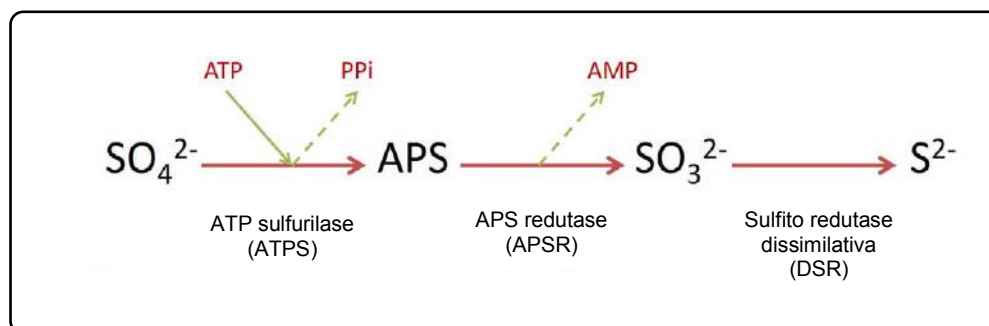


Figura 2. Etapas centrais na redução dissimilativa do sulfato. A primeira etapa consiste na ativação do sulfato (SO_4^{2-}) em adenosina fosfosulfato (APS), seguindo-se a redução a sulfito (SO_3^{2-}). A enzima sulfito redutase catalisa a redução do sulfito a sulfeto (S^{2-}), o qual é excretado na redução dissimilativa. Adaptada de Johnson *et al.*, (2017).

Bactérias redutoras de sulfato são capazes de oxidar uma variedade de compostos, incluindo ácidos mono e dicarboxílicos, álcoois, hidrocarbonetos e compostos aromáticos. Acetato, lactato e etanol estão entre os substratos mais utilizados, e mais de 100 diferentes compostos têm sido relatados como sendo substrato para esse grupo de microrganismos, demonstrando sua grande diversidade metabólica (Birkeland, 2005; Muyzer e Stam, 2008). Essa alta diversidade fisiológica explica a ocorrência de BRS em vários ambientes onde o sulfato está presente, como solo (Stubner e Meuser, 2000), regiões geotermiais (Kaksonen *et al.*, 2006), rúmen (Pado e Pawłowska-Ćwięk, 2005), reservatórios de petróleo (Sette *et al.*, 2007), dentre outros.

Com base em análises comparativas de seqüências do 16S RNA, BRS conhecidas são agrupadas em sete grupos filogenéticos: cinco no domínio Bacteria e dois no domínio Archaea. A maioria das BRS pertencem a aproximadamente 23 gêneros dentro do grupo Deltaproteobacteria, seguidas por BRS gram-positivas dentro do grupo Clostridia (*Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus* e *Desulfosporomusa*). Três grupos filogenéticos - Nitrospirae (gênero *Thermodesulfovibrio*), Thermodesulfobacteria (gênero *Thermodesulfobacterium*) e Thermodesulfobiaceae (gênero *Thermodesulfobium*) contêm apenas redutores de sulfato termofílicos. No domínio Archaea, há

representantes de BRS no Euriarchaeota (gênero *Archaeoglobus*) e no Crenarchaeota (gêneros *Thermocodium* e *Calditerrivita*) (Muyzer e Stams, 2008).

1.4. Principais formas de controle do *souring* biogênico

1.4.1. Remoção de sulfato

Uma das primeiras opções para se prevenir a produção de sulfeto de hidrogênio na indústria do petróleo inclui o pré-tratamento da água de injeção utilizando-se membranas de nanofiltração (Gieg *et al.*, 2011). Essa técnica visa à remoção de íons sulfato da água, o que é particularmente importante em operações em alto-mar, onde as concentrações de sulfato podem ser bastante elevadas. A redução da disponibilidade do acceptor de elétrons das BRS tem efeito direto sobre a produção de H₂S no reservatório. No entanto, é uma técnica de elevado custo e que não remove completamente o sulfato da água de injeção (Vance e Thrasher, 2005; Gieg *et al.*, 2011), havendo, pois, a necessidade da adoção de medidas complementares para redução do *souring* biogênico.

1.4.2. Biocidas

Diversos biocidas de amplo espectro incluindo glutaraldeído, sulfato de tetrakis(hidroximetil)fosfônio (THPS) e cloreto de benzalcônio são utilizados para inibição do crescimento de BRS. Os biocidas têm a vantagem de serem relativamente simples para administrarem. No entanto, têm elevado custo e requerem aplicações frequentes ou mesmo contínuas para serem eficientes. Além disso, alguns são potencialmente perigosos aos trabalhadores e ao meio ambiente, e seu uso contínuo pode levar à seleção de populações microbianas resistentes (Videla, 2002; Gieg *et al.*, 2011). O THPS é eficiente contra BRS planctônicas e em biofilmes, além de ser capaz de dissolver sulfetos de ferro (Xu e Gu *et al.*, 2015), sendo por isso um dos principais biocidas utilizados no controle do *souring* biogênico.

1.4.3. Nitrato e nitrito

A adição de nitrato ou nitrito à água de injeção pode inibir a produção de sulfeto de hidrogênio, uma vez que esses compostos servem como aceptores de elétrons para bactérias heterotróficas que competem com as BRS por doadores de elétrons comuns. A competição entre esses dois grupos fisiológicos pode resultar

na exclusão competitiva das BRS (Davidova *et al.*, 2001). Além disso, a presença de intermediários da redução do nitrato, como óxido nitroso e óxido nítrico, eleva o potencial redox e conseqüentemente inibem a produção de sulfeto de hidrogênio (Hubert *et al.*, 2003).

Em outro mecanismo, bactérias oxidantes de sulfeto e redutoras de nitrato ou nitrito (BOS-RN) usam o nitrato ou o nitrito para reoxidar o sulfeto produzido pelas BRS a S⁰ e sulfato, criando um ciclo de enxofre envolvendo BOS-RN e BRS que resulta na remoção de sulfeto (Hubert *et al.*, 2003). Apesar de parecer bastante promissor para o controle do *souring* biogênico, o uso de nitrato e nitrito pode aumentar o risco de corrosão pela formação de formas agressivas de enxofre, tais como polisulfeto, S⁰_(aq) e tiosulfato por meio da oxidação simultânea do sulfeto e redução do nitrato por BOS-RN (Nemati *et al.*, 2001; Hubert *et al.*, 2005; Rempel *et al.*, 2006).

1.4.4. Molibdato

O inibidor metabólico molibdato (MoO₄²⁻), é um análogo que inibe especificamente a redução do sulfato. O molibdato entra na célula por um sistema de transporte de sulfato e interfere com a formação de adenosina fosfosulfato (APS), a forma ativa de sulfato na célula durante as reduções assimilativa e dissimilativa de sulfato. A presença de molibdato leva à formação de adenosina fosfomolibdato na célula, em vez de adenosina fosfosulfato, o que provoca escassez de compostos de enxofre reduzido necessários ao crescimento bacteriano (Patidar e Tare, 2005; Greene *et al.*, 2006). Além disso, adenosina fosfomolibdato é instável e hidrolisa espontaneamente a AMP e molibdato, esgotando as reservas de ATP na célula (Greene *et al.*, 2006). Em decorrência da baixa eficiência do molibdato em inibir o crescimento de BRS em ambiente salino, quantidades elevadas são necessárias para tratar a água de injeção (cerca de 3.000 ppm). Isso aumenta os custos de aplicação e limita o seu uso em larga escala para controle do *souring* biogênico (Hitzman *et al.*, 1998; De Sousa *et al.*, 2010).

1.4.5. Biosurfactantes – moléculas promissoras

Surfactantes, seja de origem biológica ou química, são moléculas anfipáticas que podem reduzir a tensão interfacial e superficial por se acumularem na interface de fluidos imiscíveis e formarem estruturas agregadas,

tais como micelas (Van Hamme *et al.*, 2006). Os surfactantes são constituídos de um grupo hidrofílico e outro hidrofóbico. O grupo apolar é frequentemente hidrocarbônico. Já a parte polar apresenta muitas variações, o que leva à classificação dos surfactantes em aniônicos, catiônicos, não-iônicos ou zwitteriônicos (Banat *et al.*, 2000).

Os surfactantes produzidos por certas bactérias, fungos e leveduras são moléculas complexas e compreendem diferentes estruturas que incluem peptídeos, glicolipídeos, glicopeptídeos, ácidos graxos e fosfolipídeos (Desai e Banat, 1997). Os biosurfactantes são vantajosos em relação aos surfactantes sintéticos em decorrência da baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, maior estabilidade em temperatura e salinidade elevadas, e possibilidade de produção a partir de substratos renováveis (Faria *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2011a; Lima *et al.*, 2011b).

Alguns biosurfactantes produzidos por bactérias do gênero *Bacillus* são conhecidos como potentes tensoativos, com capacidade de redução da tensão superficial da água de 72 mN m^{-1} para cerca de 27 mN m^{-1} (Mnif e Ghribi, 2015). Apresentam ainda atividade antimicrobiana contra várias espécies de microrganismos (Shaligram e Singhal, 2010; Sriram *et al.*, 2011). Estruturalmente, essas moléculas são classificadas como lipopeptídeos e são compostas de um peptídeo cíclico ligado a uma cadeia de ácido graxo. A variação no tipo e tamanho da cadeia de ácido graxo, bem como a composição dos aminoácidos e tamanho da porção peptídica, agrupa os lipopeptídeos de *Bacillus* spp. em três principais famílias: as iturinas, as surfactinas e as fengicinas (Figura 3) (Raaijmakers *et al.*, 2010).

Os lipopeptídeos são metabólitos secundários sintetizados por grandes complexos enzimáticos multifuncionais denominados peptídeo sintetases não ribossomais (NRPS) (Finking e Marahiel 2004). As NRPS levam a uma grande heterogeneidade entre os lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* spp. com relação à composição e sequência dos resíduos dos aminoácidos, à ciclização da cadeia peptídica e à composição, comprimento, e ramificação da cadeia de ácido graxo (Mnif e Ghribi, 2015). A porção peptídica pode conter sete α -aminoácidos (surfactinas e iturinas) ou dez α -aminoácidos (fengicinas) ligados a um β -amino ácido graxo (iturinas) ou β -hidroxi ácido graxo (surfactina e fengicinas). O

comprimento da cadeia de ácido graxo pode variar de C₁₂ a C₁₆ para surfactinas, de C₁₄ a C₁₇ para iturinas, e de C₁₄ a C₁₈ para fengicinas (Mnif e Ghribi, 2015). Diferentes compostos homólogos em cada família de lipopeptídeos são geralmente coproduzidos (Vater *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2015). O padrão de aminoácidos e cadeias de ácidos graxos nas moléculas produzidas depende não apenas da linhagem produtora, mas ainda dos componentes do meio de cultura e das condições de cultivo (Liu *et al.*, 2012).

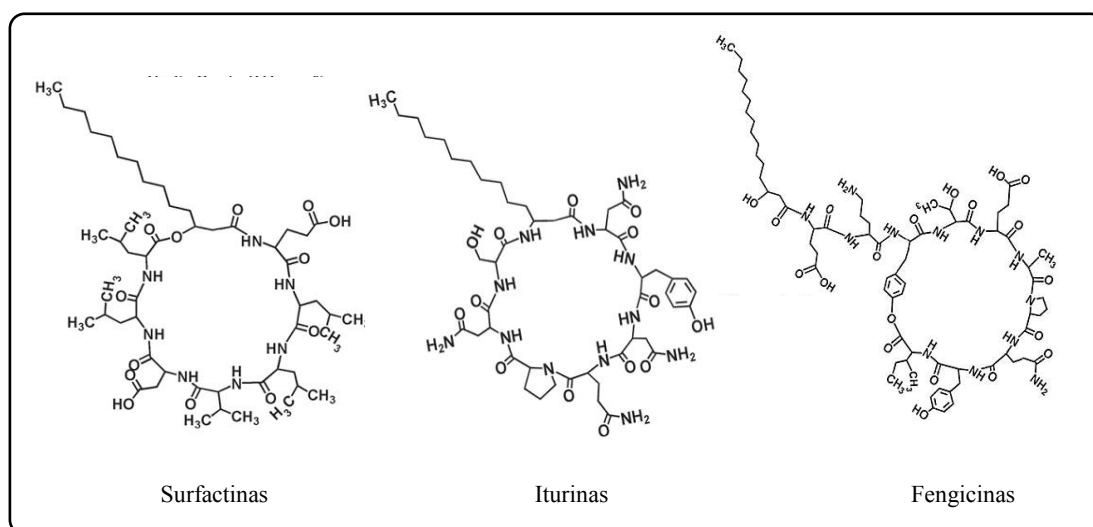


Figura 3. Estrutura primária de lipopeptídeos da família das surfactinas, iturinas e fengicinas. Adaptada de Gong *et al.* (2015).

Lipopeptídeos da mesma família apresentam variações nos resíduos de alguns aminoácidos, bem como na composição do ácido graxo e, por isso, essas moléculas podem apresentar nomenclaturas distintas (Tabela 1). Por exemplo, os lipopeptídeos iturina A e C, mixirinas, micosubtilina, mojavensisina e bacilomicina D, F e L e bacilopeptina estão agrupados na mesma família, a das iturinas. As liquenisinas diferem das surfactinas por apresentarem glutamina (Gln) em vez de ácido glutâmico (-Glu) no resíduo 1. A família das fengicinas inclui os lipopeptídeos cíclicos fengicina e plipastatinas (Cochrane e Vederas, 2016).

Tabela 1. Alguns lipopeptídeos da família das surfactinas, iturinas e fengicinas, com as respectivas seqüências de aminoácidos

Família surfactinas (7 α -aminoácidos + β -hidroxi ácido graxo C ₁₂ a C ₁₆)										
Lipopeptídeos	1	2	3	4	5	6	7			
Surfactina	L-Glu	L-Leu	D-Leu	L-Val	L-Asp	D-Leu	L-Leu			
[Ala4]surfactina	L-Glu	L-Leu	D-Leu	L-Ala	L-Asp	D-Leu	L-Leu			
[Leu4]surfactina	L-Glu	L-Leu	D-Leu	L-Leu	L-Asp	D-Leu	L-Leu			
[Ile4]surfactina	L-Glu	L-Leu	D-Leu	L-Ile	L-Asp	D-Leu	L-Leu			
[Val7]surfactina	L-Glu	L-Leu	D-Leu	L-Val	L-Asp	D-Leu	L-Val			
[Ile7]surfactina	L-Glu	L-Leu	D-Leu	L-Val	L-Asp	D-Leu	L-Ile			
[Ile2,4]surfactina	L-Glu	L-Ile	D-Leu	L-Ile	L-Asp	D-Leu	L-Leu			
[Val2,7]surfactina	L-Glu	L-Val	D-Leu	L-Val	L-Asp	D-Leu	L-Val			
[Val2,Ile7]surfactina	L-Glu	L-Val	D-Leu	L-Val	L-Asp	D-Leu	L-Ile			
[Ile2,Val7]surfactina	L-Glu	L-Ile	D-Leu	L-Val	L-Asp	D-Leu	L-Val			
[Ile2,4,7]surfactina	L-Glu	L-Ile	D-Leu	L-Ile	L-Asp	D-Leu	L-Ile			
Liquenisina	L-Gln	L-Leu	D-Leu	L-Val	L-Asp	D-Leu	L-Ile			
[Ile4]liquenisina	L-Gln	L-Leu	D-Leu	L-Ile	L-Asp	D-Leu	L-Ile			
[Val7]liquenisina	L-Gln	L-Leu	D-Leu	L-Val	L-Asp	D-Leu	L-Val			
[Ile2,4]liquenisina	L-Gln	L-Ile	D-Leu	L-Ile	L-Asp	D-Leu	L-Ile			

Família iturinas (7 α -aminoácidos + β -amino ácido graxo C ₁₄ a C ₁₇)										
Lipopeptídeos	1	2	3	4	5	6	7			
Iturina A	L-Asn	D-Tyr	D-Asn	L-Gln	L-Pro	D-Asn	L-Ser			
Mixirina	L-Asn	D-Tyr	D-Asn	L-Gln	L-Pro	D-Asn	L-Pro			
Micosubtilina	L-Asn	D-Tyr	D-Asn	L-Gln	L-Pro	D-Ser	L-Asn			
Iturina C	L-Asp	D-Tyr	D-Asn	L-Gln	L-Pro	D-Asn	L-Ser			
Mojavenisina	L-Asp	D-Tyr	D-Asn	L-Gln	L-Pro	D-Asn	L-Asn			
Bacilomicina D	L-Asn	D-Tyr	D-Asn	L-Pro	L-Glu	D-Ser	L-Thr			
Bacilomicina F	L-Asn	D-Tyr	D-Asn	L-Gln	L-Pro	D-Asn	L-Thr			
Bacilomicina L	L-Asp	D-Tyr	D-Asn	L-Ser	L-Gln	D-Ser	L-Thr			
Bacilomicina Lc	L-Asn	D-Tyr	D-Asn	L-Ser	L-Glu	D-Ser	L-Thr			

Família fengicinas (10 α -aminoácidos + β -hidroxi ácido graxo C ₁₄ a C ₁₈)										
Lipopeptídeos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fengicina A ₁	L-Glu	D-Orn	D-Tyr	D-Thr	L-Glu	D-Ala	L-Pro	L-Gln	L-Tyr	L-Ile
Fengicina A ₂	L-Glu	D-Orn	D-Tyr	D-Thr	L-Glu	D-Ala	L-Pro	L-Gln	L-Tyr	L-Val
Fengicina B ₁	L-Glu	D-Orn	D-Tyr	D-Thr	L-Glu	D-Val	L-Pro	L-Gln	L-Tyr	L-Ile
Fengicina B ₂	L-Glu	D-Orn	D-Tyr	D-Thr	L-Glu	D-Val	L-Pro	L-Gln	L-Tyr	L-Val
Fengicina C ₁	L-Glu	D-Orn	D-Tyr	D-Thr	L-Glu	D-Leu/Ileu	L-Pro	L-Gln	L-Tyr	L-Val
Fengicina C ₂	L-Glu	D-Orn	D-Tyr	D-Thr	L-Glu	D-Val	L-Pro	L-Gln	L-Thr	L-Ile
Fengicina S	L-Glu	D-Orn	D-Tyr	D-Ser	L-Glu	D-Val	L-Pro	L-Gln	L-Tyr	L-Ile
Plipastatina A	L-Glu	D-Orn	L-Tyr	D-Thr	L-Glu	D-Ala	L-Pro	L-Gln	D-Tyr	L-Ile
Plipastatina B	L-Glu	D-Orn	L-Tyr	D-Thr	L-Glu	D-Val	L-Pro	L-Gln	D-Tyr	L-Ile

Ácido glutâmico (Glu); Ácido aspártico (Asp); Alanina (Ala); Glutamina (Gln); Leucina (Leu); Isoleucina (Ile); Ornitina (Orn); Prolina (Pro); Serina (Ser); Tirosina (Tyr); Treonina (Thr). Adaptada de Cochrane e Vederas (2016).

Os lipopeptídeos das famílias das iturinas e fengicinas são bem reconhecidos por sua ampla atividade antifúngica contra uma variedade de fungos filamentosos e leveduras, mas restrita atividade antibacteriana (Cochrane e Vederas, 2016; Zerriouh, *et al.*, 2011). Já as surfactinas têm ampla ação antimicrobiana, incluindo antibacteriana, antiviral, antimicoplasma e antifúngica,

embora essa última seja menos relatada (Meena e Kanwar, 2015). A atividade antimicrobiana desses lipopeptídeos é principalmente decorrente da sua interação com a membrana plasmática, provocando um desarranjo na sua estrutura e formação de poros que aumentam a permeabilidade a íons, o que por fim pode levar ao rompimento da membrana. A habilidade em formar poros condutores de íons depende da composição dos lipídeos da membrana, bem como da estrutura do lipopeptídeo (Liu *et al.*, 2014; Mnif e Ghribi, 2015).

Além da reconhecida atividade antimicrobiana, os lipopeptídeos apresentam outra característica desejável na indústria do petróleo: são excelentes tensoativos, o que possibilita sua utilização em estratégias de biorremediação e de recuperação terciária melhorada por microrganismos (MEOR). A MEOR baseia-se na utilização de microrganismos e/ou seus metabólitos, como biopolímeros, ácidos e gases, com a finalidade de aumentar a recuperação do petróleo (Sen, 2008; Safdel *et al.*, 2017). Nos processos de MEOR, biossurfactantes são especialmente utilizados para diminuir a viscosidade do óleo e, conseqüentemente, aumentar a sua recuperação (Bordoloi e Konwar, 2008; Fernandes *et al.*, 2016). Há três principais estratégias para utilização desses compostos em MEOR: (i) injeção do microrganismo produtor de biossurfactante no reservatório, com conseqüente multiplicação do microrganismo *in situ* nas rochas do reservatório; (ii) injeção de nutrientes selecionados no reservatório para estimular o crescimento de microrganismos autóctones produtores de biossurfactantes; (iii) produção de biossurfactante *ex situ* e sua subseqüente injeção no reservatório (Banat, 1995).

Portanto, em razão das características apresentadas, biossurfactantes constituem moléculas promissoras para o controle de BRS na indústria do petróleo. Investigações da ação antimicrobiana dos lipopeptídeos produzidos por *Bacillus*, um dos mais potentes tensoativos, contra BRS, podem conduzir à descoberta de novas moléculas para o controle do *souring* biogênico.

1.5. Referências

- Banat, I. M. 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresource Technology*, 51, 1-12.
- Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 495-508.
- Bastin E.S., Greer F.E., Merritt C.A., Moulton G. 1926. The presence of sulphate reducing bacteria in oil field waters. *Science*, 63, 21–24.
- Birkeland, N-K. 2005. Sulfate-reducing bacteria and archaea. In: Ollivier, B., Magot, M. (Eds.), *Petroleum Microbiology*. American Society of Microbiology, Washington, USA, p. 35-54.
- Bordoloi, N.K., Konwar, B.K. 2008. Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 63, 73–82.
- Cochrane, S.A., Vederas, J.C. 2016. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Medicinal Research Reviews*, 36, 4–31.
- Davidova, I., Hicks, M.S., Fedorak, P.M., Suflita, J.M. 2001. The influence of nitrate on microbial processes in oil industry production waters. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 27, 80-86.
- De Sousa, K.A., Cammarota, M.C., Sérvulo, E.F.C., 2010. Efeito da aplicação de nitrato na redução biogênica de sulfeto sob diferentes concentrações iniciais de bactérias redutoras de nitrato e sulfato. *Química Nova*, 33, 273-278.
- Desai, J.D., Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 47-64.
- Elmawgoud, H.A., Elshiekh, T.M., Khalil, S.A., Alsabagh, A.M., Tawfik, M. 2015. Modeling of hydrogen sulfide removal from Petroleum production facilities using H₂S scavenger. *Egyptian Journal of Petroleum*, 24, 131–137.
- Faria, A.F., Martinez, D.S.T., Barbosa, G.N.O., Vaz, B.G., Silva, I.S., Garcia, J.S., Tótola, M.R., Eberlin, M.N., Grossman, M., Alves, O.L., Durrant, L.R., 2011. Production and structural characterization of surfactin (C₁₄/Leu₇) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. *Process Biochemistry*, 46, 1951-1957.
- Fernandes, P.L., Rodrigues, E.M., Paiva, F.R., Ayupe, B.A.L., McInerney, M.J., Tótola, M.R. 2016. Biosurfactant, solvents and polymer production by *Bacillus subtilis* RI4914 and their application for enhanced oil recovery. *Fuel*, 180, 551–557.
- Finking, R., Marahiel, M.A. 2004. Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annual Review of Microbiology*, 58, 453–488.
- Gieg, L.M., Jack, T.R., Foght, J.M., 2011. Biological souring and mitigation in oil reservoirs. *Applied Microbiology Biotechnology*, 92, 263–282.
- Gong, A-D., Li, H-P., Yuan, Q-S., Song, X-S., Yao, W., He, W-J., Zhang, J-B., Liao, Y-C. 2015. Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin a from *Bacillus*

amyloliquefaciens S76-3 from Wheat Spikes against *Fusarium graminearum*. PLOS ONE, 17, 1-18.

Greene, E.A., Brunelle, V., Jenneman, G.E., Voordouw, G. 2006. Synergistic inhibition of microbial sulfide production by combinations of the metabolic inhibitor nitrite and biocides. Applied and Environmental Microbiology, 72, 7897-7901.

Hitzman, D.O., Sperl, G.T., Sandbeck, K.A. 1998. Patent number 5.750.392. Composition for reducing the amount of and preventing the formation of hydrogen sulfide in an aqueous system, particularly in an aqueous system used in oil field applications. United States Patent. 5 p.

Hubert, C., Nemati, M., Jenneman, G., Voordouw, G. 2003. Containment of biogenic sulfide production in continuous up-flow packed-bed bioreactors with nitrate or nitrite. Biotechnology Progress, 19, 338-345.

Hubert, C., Nemati, M., Jenneman, G., Voordouw, G. 2005. Corrosion risk associated with microbial souring control using nitrate or nitrite. Applied Microbiology and Biotechnology, 68, 272-282.

Hubert, C., Voordouw, G. 2007. Oil field souring control by nitrate-reducing *Sulfurospirillum* spp. that outcompete sulfate-reducing bacteria for organic electron donors. Applied and Environmental Microbiology, 73, 2644-2652.

Johnson, R.J., Folwella, B.D., Wirekoha, A., Frenzela, M., Skovhus, T.L. 2017. Reservoir Souring-Latest developments for application and mitigation. Journal of Biotechnology.

Kaksonen, A.H., Spring, S., Schumann, P., Kroppenstedt, R.M., Puhakka, J.A. 2006. *Desulfotomaculum thermosubterraneum* sp. nov., a thermophilic sulfate-reducer isolated from an underground mine located in a geothermally active area. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56, 2603-2608.

Korenblum, E., Von Der Weid, I., Santos, A.L.S., Rosado, A.S., Sebastián, G.V., Coutinho, C.M.L.M., Magalhães, F.C.M., de Paiva M.M, Seldin, L., 2005. Production of antimicrobial substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* H2O-1 and *B. licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil. Journal of Applied Microbiology, 98, 667-675.

Lima, T.M.S., Procópio, L.C., Brandão, F.D., Carvalho, A.M.X., Tótola, M.R., Borges, A.C., 2011b. Biodegradability of bacterial surfactants. Biodegradation, 22, 585-592.

Lima, T.M.S., Procópio, L.C., Brandão, F.D., Leão, B.A., Tótola, M.R., Borges, A.C., 2011a. Evaluation of bacterial surfactant toxicity towards petroleum degrading microorganisms. Bioresource Technology, 102, 2957-2964.

Liu, J., Hagberg, I., Novitsky, L., Hadj-Moussa H., Avis, T.J. 2014. Interaction of antimicrobial cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* influences their effect on spore germination and membrane permeability in fungal plant pathogens. Fungal Biology, 118, 855-61.

Liu, X., Ren, B., Gao, H., Liu, M., Dai, H., Song, F., Yu, Z., Wang, S., Hu, J., Kokare, C.R., Zhang, L., 2012. Optimization for the production of surfactin with a new synergistic antifungal activity. PLOS ONE. 7, 1-9.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D.P. *Microbiologia de Brock*. 12^o Edição. Pearson. 2010. 1160 p.

Meena, K.R., Kanwar, S.S. 2015. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *BioMed Research International*, 2015, 1-10.

Mnif, I., Ghribi, D., 2015. Review-Lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for industrial, biomedical environmental applications. *Journal of Peptide Science*, 104, 129-147.

Muyzer, G., Stams, A.J.M. 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews*, 6, 441-454.

Nemati, M., Jenneman, G.E., Voordouw, G. 2001. Impact of nitrate-mediated microbial control of souring in oil reservoirs on the extent of corrosion. *Biotechnology Progress*, 17, 852-859.

Pado, R., Pawłowska-Ćwięk, L. 2005. The uptake and accumulation of iron by the intestinal bacterium *Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771. *Folia Biologica*, 53, 79-81.

Patidar, S.K., Tare, V. 2005. Effect of molybdate on methanogenic and sulfidogenic activity of biomass. *Bioresource Technology*, 96, 1215-1222.

Planckaert, M. 2005. Reservoir souring: mechanisms and prevention. In: Ollivier, B., Magot, M. (Eds.), *Petroleum Microbiology*. American Society of Microbiology, Washington, USA, p. 3-19.

Raaijmakers, J.M., Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M. 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34,1037-1062.

Reiffenstein, R.J, Hulbert, W.C., Roth, S.H., 1992. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 32, 109-134.

Rempel, C.L., Evitts, R.W., Nemati, M. 2006. Dynamics of corrosion rates associated with nitrite or nitrate mediated control of souring under biological conditions simulating an oil reservoir. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 878-886.

Safdel, M., Anbaz, M.A., Daryasafar, A., Jamialahmadi, M. 2017. Microbial enhanced oil recovery, a critical review on worldwide implemented field trials in different countries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 74, 159–172.

Sen, R. 2008. Biotechnology in petroleum recovery: the microbial EOR. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34, 714-724.

Sette, L.D., Simioni, K.C.M., Vasconcellos, S.P., Dussan, L.J., Neto, E.V.S., Oliveira, V.M. 2007. Analysis of the composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91, 253-266.

Shaligram, N.S., Rekha S. Singhal, R.S., 2010. Surfactin - a review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 119-134.

- Sriram, M.I., Kalishwaralal, K., Deepak, V., Gracerosept, R., Srisakthi, K., Gurunathan, S., 2011. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. *Colloids and Surface B Biointerfaces*, 85, 174-181.
- Stubner, S., Meuser, K. 2000. Detection of *Desulfotomaculum* in an Italian rice paddy soil by 16S ribosomal nucleic acid analyses. *FEMS Microbiology Ecology*, 34, 73-80.
- Tang, K., Baskaran, V., Nemati, M. 2009. Bacteria of the sulphur cycle: an overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochemical Engineering Journal*, 44, 73-94.
- Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P. 2006. Physiological aspects part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances*, 24, 604-620.
- Vance, I., Thrasher, D.R. 2005. Reservoir souring: mechanisms and prevention. In: Ollivier, B., Magot, M. (Eds.), *Petroleum Microbiology*. American Society of Microbiology, Washington, USA, p. 123-142.
- Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N., Cameotra, S.S., 2002. Matrix-assisted 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 Environmental Microbiology*, 68, 6210-6219.
- Videla, H.A. 2002. Prevention and control of biocorrosion. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 49, 259-270.
- Xu, D., Gu, T., 2015. The war against problematic biofilms in the oil and gas industry. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 7, 1-2.
- Yang, H., Li, X., Li, X., Yu, H., Shen, Z., 2015. Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and surfactin by RP-HPLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 2529-2542.
- Zeriouh, H., Romero, D., García-Gutiérrez, L., Cazorla, F.M., De Vicente, A., Pérez-García, A. 2011. The iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24, 1540-1552.

Capítulo 2

*Ação antimicrobiana de Bacillus subtilis isolados da Ilha da Trindade
contra bactéria redutora de sulfato*

Ação antimicrobiana de *Bacillus subtilis* isolados da Ilha da Trindade contra bactéria redutora de sulfato

Resumo

Neste trabalho, 8 isolados do gênero *Bacillus* foram avaliados quanto à produção de biossurfactantes com ação antimicrobiana contra a bactéria redutora de sulfato (BRS) *Desulfovibrio alaskensis* NCIMB 13491. Quatro isolados de *Bacillus subtilis* - *B. subtilis* TR12, *B. subtilis* TR22, *B. subtilis* TR35II e *B. subtilis* TR47II, provenientes de solos da ilha oceânica da Trindade, produziram extratos com ação antimicrobiana contra *D. alaskensis* em ensaio de difusão em ágar. O maior efeito antimicrobiano foi observado com o extrato bruto de *B. subtilis* TR47II, com halo médio de inibição de 21,6 mm. O extrato bruto de *B. subtilis* TR47II manteve a ação antimicrobiana quando armazenado por até 12 horas a 40 °C. O efeito antimicrobiano diminuiu com o aumento da temperatura até 100 °C, e nenhuma atividade antimicrobiana foi observada após autoclavagem a 121 °C por 15 minutos. A detecção da atividade antimicrobiana por bioautografia indicou que a molécula ativa do extrato de *B. subtilis* TR47II provavelmente é um biossurfactante lipopeptídico da família das iturinas, o que é relatado pela primeira vez. Os resultados obtidos incentivam a purificação e caracterização estrutural da molécula ativa de *B. subtilis* TR47II.

Palavras-chave: biossurfactante, *Bacillus subtilis*, ação antimicrobiana, bactéria redutora de sulfato, indústria do petróleo.

2.1. Introdução

Surfactantes microbianos ou biossurfactantes são um grupo de moléculas anfipáticas com ampla variedade estrutural, produzidas por diferentes microrganismos (Van Hamme *et al.*, 2006). Tais moléculas são constituídas de uma região hidrofílica, que pode conter um ácido, peptídeos, mono, di ou polissacarídeos, e uma região hidrofóbica compreendendo ácidos graxos ou cadeias hidrocarbônicas saturadas ou insaturadas (Banat *et al.*, 2010). Em razão de suas diversas propriedades, como a habilidade de diminuir a tensão superficial e interfacial de líquidos e formar micelas e microemulsões entre duas fases diferentes, os biossurfactantes têm sido usados em diversas aplicações industriais e ambientais (Banat *et al.*, 2010; Marchant e Banat, 2012).

Alguns biossurfactantes produzidos por bactérias do gênero *Bacillus* são conhecidos como potentes tensoativos, com capacidade de redução da tensão superficial da água de 72 mN m^{-1} para cerca de 27 mN m^{-1} (Mnif e Ghribi, 2015). Estruturalmente, essas moléculas são classificadas como lipopeptídeos e são compostas de um peptídeo cíclico ligado a uma cadeia de ácido graxo. A variação no tipo e tamanho da cadeia de ácido graxo, bem como a composição dos aminoácidos e tamanho da porção peptídica, agrupa os lipopeptídeos de *Bacillus* sp. em três principais famílias: as surfactinas, as iturinas e as fengicinas (Raaijmakers *et al.*, 2010). Cada família contém variantes com o mesmo comprimento da região peptídica, mas com diferentes resíduos de aminoácidos em posições específicas. Cada variante pode ter vários homólogos com diferentes comprimentos da cadeia lateral, o que leva a uma grande heterogeneidade estrutural (Vater *et al.*, 2002; Raaijmakers *et al.*, 2010) e confere a esses lipopeptídeos uma diversidade de propriedades distintas, incluindo ação antimicrobiana (Meena e Kanwar 2015).

Na indústria do petróleo, as substâncias antimicrobianas produzidas por *Bacillus* têm atraído a atenção para o controle do crescimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS) (Korenblum *et al.*, 2005, Gana *et al.*, 2011), as quais são consideradas o principal grupo de microrganismos envolvidos em processos de biocorrosão nesse setor (Enning e Garrelfs, 2014). O crescimento de BRS está associado à recuperação secundária do petróleo, na qual água do mar rica em

sulfato é frequentemente utilizada para manter a pressão interna dos reservatórios e aumentar a eficiência de recuperação do petróleo (Xu e Gu, 2015).

As BRS formam um grupo de bactérias anaeróbias que utilizam principalmente o sulfato como acceptor final de elétrons na respiração, cuja atividade resulta na produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S). Esse processo biológico de produção de H₂S em reservatórios de petróleo é conhecido na indústria como *souring* biogênico (Hasegawa *et al.*, 2014). A produção de H₂S no reservatório diminui a qualidade do petróleo extraído, aumenta a corrosão dos equipamentos e tanques, pode resultar em entupimento dos reservatórios decorrente da precipitação de sulfeto de ferro e, como consequência, aumenta os custos de produção do petróleo (Gieg *et al.*, 2011). Além disso, o H₂S é tóxico e apresenta forte odor, o que diminui a qualidade do ar e põe em risco a saúde dos operadores (Reiffenstein *et al.*, 1992).

Estratégias para controlar o crescimento de BRS na indústria de petróleo incluem principalmente o uso de biocidas, destacando-se o sulfato de tetrakis hidroximetil fosfônio (THPS). No entanto, o uso prolongado do mesmo biocida tem propiciado a seleção de cepas resistentes, o que aumenta os custos e os riscos ambientais associados à aplicação desse composto em alta dosagem (Xu e Gu, 2015).

A necessidade de apresentar características tais como baixo custo, atendimento a exigências ambientais, eficiência em amplo espectro e ser seguro para os operadores, limita o uso de biocidas para o controle de BRS na indústria de petróleo (Xu e Gu, 2015). Os biossurfactantes, por apresentarem baixa toxicidade (Lima *et al.*, 2011a), alta biodegradabilidade (Lima *et al.*, 2011b) e possibilidade de produção a partir de substratos renováveis (Faria *et al.*, 2011), podem ser uma alternativa aos biocidas atualmente utilizados, se produzidos em larga escala. Neste trabalho, nosso objetivo foi investigar a ação antimicrobiana de extratos brutos contendo biossurfactantes obtidos de oito isolados de *Bacillus* sp. contra a BRS *D. alaskensis* NCIMB 13491.

2.2. Materiais e métodos

2.2.1. Microrganismos e condições de cultivo

As bactérias selecionadas para produção de biossurfactantes pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio

Ambiente (Tabela 1). As culturas de trabalho foram reativadas em meio ágar triptona de soja (TSA-Difco) e incubadas por 24 horas sob temperatura de 30 °C. As culturas foram mantidas a 4 °C, sendo repicadas mensalmente no mesmo meio de cultivo.

A bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio alaskensis* NCIMB 13491, isolada de reservatório de petróleo com histórico de *souring* no Alasca (Feio *et al.*, 2004), foi utilizada como microrganismo teste nos ensaios de inibição. Essa bactéria foi mantida a 30 °C em meio anaeróbio Postgate C (Postgate 1984) modificado contendo (g L⁻¹): KH₂PO₄ (0,5), NH₄Cl (1,0), NaCl (25,0), Na₂SO₄ (4,5), CaCl₂.6H₂O (0,06), MgSO₄.6H₂O (0,06), C₆H₅Na₃O₇.2H₂O (0,1), extrato de levedura (1,0), lactato de sódio 50 % m v⁻¹ (9,4 mL), FeSO₄.7H₂O (0,004), tioglicolato de sódio (0,1), resazurina 0,25 % (4,0 mL); pH 7,5. A anaerobiose do meio foi obtida por fervura durante 10 minutos, seguindo-se purga com fluxo de N₂ durante 15 minutos. O meio foi distribuído em frascos de vidro sob purga constante de N₂. Em seguida, os frascos foram selados com tampa de borracha e lacre de alumínio e autoclavados a 121 °C por 15 minutos.

Tabela 1. Isolados produtores de biossurfactantes utilizados no trabalho

Código	Identificação	Local de isolamento	Referência
TR12	<i>Bacillus subtilis</i>	Solo da Ilha da Trindade	Da Silva <i>et al.</i> , 2015
TR14	<i>Bacillus</i> sp.	Solo da Ilha da Trindade	Da Silva <i>et al.</i> , 2015
TR14mut	<i>Bacillus</i> sp.	Solo da Ilha da Trindade	Este estudo
TR22	<i>Bacillus subtilis</i>	Solo da Ilha da Trindade	Da Silva <i>et al.</i> , 2015
TR27II	<i>Bacillus subtilis</i>	Solo da Ilha da Trindade	Da Silva <i>et al.</i> , 2015
TR35II	<i>Bacillus subtilis</i>	Solo da Ilha da Trindade	Da Silva <i>et al.</i> , 2015
TR47II	<i>Bacillus subtilis</i>	Solo da Ilha da Trindade	Da Silva <i>et al.</i> , 2015
RI4967	<i>Bacillus subtilis</i>	*Água de produção	Este estudo

*Isolamento a partir de água de produção do campo de exploração de petróleo da formação Rio Itaúnas, Conceição da Barra, Espírito Santo.

2.2.2 Produção dos biossurfactantes

As bactérias foram transferidas do meio TSA para tubos de vidro contendo 5,0 mL de meio TSB (Difco), seguindo-se incubação a 30 °C em agitador orbital (New Brunswick Scientific), sob agitação constante de 200 rpm por aproximadamente 18 horas. Duas transferências consecutivas (1% v v⁻¹) foram realizadas para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio mineral (MM) (g L⁻¹): K₂HPO₄ (13,9), KH₂PO₄ (2,7), extrato de levedura (0,05), NH₄NO₃ (1,0); pH 7,0. O meio foi suplementado após autoclavagem (121 °C, 15 minutos) com solução de glicose (20 g L⁻¹) e de micronutrientes (50 mL L⁻¹) (g L⁻¹): EDTA (0,5), MgSO₄.7H₂O (3,0), MnSO₄.H₂O (0,5), NaCl (1,0), CaCl₂.2H₂O (0,1), CoCl₂.6H₂O (0,1), ZnSO₄.7H₂O (0,1), FeSO₄.7H₂O (0,1), CuSO₄.5H₂O (0,01), Na₂MoO₄.2H₂O (0,01), Na₂O₄Se (0,01), Na₂WO₄.2H₂O (0,01), NiCl₂.6H₂O (0,02). As culturas foram incubadas a 30 °C e 200 rpm por 24 horas. O inóculo foi preparado por centrifugação da cultura a 10.000 g por 15 minutos e as células foram lavadas em solução de NaCl (8,5 g L⁻¹). Frascos Erlenmeyer de 1,0 L contendo 500 mL do MM foram inoculados com um volume de inóculo suficiente para se obter uma densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) correspondente a 0,05. As diferentes fontes de carbono (20 g L⁻¹) e nitrogênio (0,35 g L⁻¹) do MM para produção dos biossurfactantes foram definidas a partir de estudos prévios com cada isolado, visando maximizar a produção de biossurfactantes (Tabela 2). As culturas foram incubadas a 30 °C sob agitação constante de 200 rpm, por 5 dias.

Tabela 2. Fontes de carbono e nitrogênio do meio mineral para produção de biossurfactante pelos diferentes isolados de *Bacillus* sp.

Código	* Fonte de carbono	** Fonte de nitrogênio
TR12	Sacarose	(NH ₄) ₂ SO ₄
TR14	Sacarose	(NH ₄) ₂ SO ₄
TR14mut	Sacarose	(NH ₄) ₂ SO ₄
TR47II	Sacarose	(NH ₄) ₂ SO ₄
TR35II	Glicose	(NH ₄) ₂ SO ₄
TR27II	Glicose	NH ₄ NO ₃
RI4967	Glicose	NH ₄ NO ₃
TR22	Sacarose	NH ₄ NO ₃

*20 g L⁻¹; **(NH₄)₂SO₄ (1,65 g L⁻¹), NH₄NO₃ (1,0 g L⁻¹).

2.2.3. Obtenção dos extratos brutos de biossurfactantes

Os biossurfactantes foram isolados por precipitação ácida segundo método descrito por Vater *et al.* (2002). As células foram removidas do meio de cultivo por centrifugação (10.400 g, 15 minutos, 4 °C), o sobrenadante foi recolhido e o pH ajustado para 2,0, utilizando-se HCl 6 mol L⁻¹. Após incubação a 4 °C *overnight*, os biossurfactantes precipitados foram recuperados por centrifugação (10.400 g, 20 minutos, 4 °C) e dissolvidos em água destilada, ajustando-se o pH da solução para 7,0. A diluição micelar crítica foi determinada pela medida da tensão superficial de diluições do extrato bruto de cada biossurfactante pelo método da placa Wilhelmy, utilizando-se o tensiômetro Dataphysics modelo DCAT 11EC. Os dados foram obtidos usando o software SCAT v.3.2.0.84. Soluções-estoque dos extratos, contendo 8 vezes a concentração micelar crítica-CMC, foram preparadas em água destilada e mantidas a 4 °C.

2.2.4. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos de biossurfactantes

A atividade antimicrobiana dos extratos brutos dos biossurfactantes foi avaliada pelo ensaio de difusão em ágar. Aliquota da cultura de *D. alaskensis* cultivada em meio anaeróbio Postgate C por 24 horas (DO₆₀₀ inicial de 0,05) foi misturada a 25 mL de meio ágar (1,5 %) Postgate C fundido, de modo a se obter uma concentração de aproximadamente 10⁵ UFC mL⁻¹. A mistura foi vertida em placas de Petri (90 x 15 mm). Após solidificação, poços de 5 mm de diâmetro foram furados na superfície do meio e 20 µL da solução-estoque de cada biossurfactante (8 x CMC) foram aplicados nos poços. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por aproximadamente 18 horas para completa difusão dos biossurfactantes e posteriormente incubadas a 30 °C por 6 dias em câmara de anaerobiose (Anaerobic System Thermo Forma 1025) sob atmosfera de 5 % CO₂, 10 % H₂ e 85 % de N₂. Todo o procedimento foi realizado na câmara de anaerobiose. Os diâmetros das áreas claras ao redor dos poços foram medidos com auxílio de uma régua. O experimento foi desenvolvido no delineamento em blocos casualizados (DBC), com 3 blocos e 4 repetições para cada extrato de biossurfactante. Os dados foram analisados por meio da análise de variância. As médias dos halos de inibição foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey,

adotando-se o nível de 5 % de probabilidade. O extrato bruto com maior ação antimicrobiana nesse experimento foi selecionado para estudos adicionais.

2.2.5. Extração em soxhlet e purificação do biossurfactante de *B. subtilis* TR47II

O extrato bruto de *B. subtilis* TR47II, o qual demonstrou a maior atividade de inibição contra *D. alaskensis* na etapa anterior, foi liofilizado e 0,65 g foi extraído com metanol (200 mL) em extrator soxhlet por 12 horas em temperatura aproximada de 70 °C. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo a 40 °C para obtenção do extrato seco.

Para purificação, o extrato foi aplicado em coluna cromatográfica (26 x 5,0 cm) de sílica gel 60 (70-230 mesh, Sigma-Aldrich) e eluído com aproximadamente 800 mL de clorofórmio/metanol/água nas proporções de 80:25:3,5 e 65:25:4 (v v⁻¹) sequencialmente. As frações coletadas foram analisadas por cromatografia em camada delgada F₂₅₄ (CCD; 40 x 25 mm; Sigma-Aldrich), eluídas com clorofórmio/metanol/água (65:25:4). Para revelação dos componentes eluídos nas placas CCD, as mesmas foram mergulhadas em solução de H₂SO₄ 15 % em etanol (v v⁻¹), o excesso escorrido e as placas foram aquecidas por aproximadamente 15 segundos utilizando um soprador térmico. O ácido sulfúrico é um revelador universal que indica, pela visualização da cor marrom ou preta, a presença de composto orgânico. As frações com fator de retenção (R_f) semelhantes foram agrupadas e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo a 40 °C.

2.2.6. Investigação da fração ativa do extrato do soxhlet

Para determinar a fração ativa contra *D. alaskensis*, o extrato de TR47II extraído em soxhlet e as frações principais obtidas no procedimento de purificação foram testadas pelo método de susceptibilidade em microdiluições no meio Postgate B (Postgate, 1984) modificado, contendo (g L⁻¹): KH₂PO₄ (0,5), NH₄Cl (1,0), NaCl (25,0), Na₂SO₄ (1,0), MgSO₄.7H₂O (2,0), CaCl₂.2H₂O (0,1), extrato de levedura (1,0), lactato de sódio 50% m v⁻¹ (7,0 mL), FeSO₄.7H₂O (0,5), tioglicolato de sódio (0,1), ácido ascórbico (0,1), pH 7,5. A solução de FeSO₄.7H₂O foi esterilizada por filtração (0,2 µm) e adicionada após autoclavagem do meio de cultura (121 °C por 15 minutos). As amostras foram solubilizadas em água destilada anaeróbia (5 mg mL⁻¹) e esterilizadas por

filtração (0,2 μm) em câmara de anaerobiose. Aliquotas de 100 μL foram transferidas para o primeiro poço de uma microplaca de 96 poços (Nest) contendo 100 μL de meio Postgate B (duas vezes concentrado). A solução foi homogeneizada e serialmente diluída duas vezes em 100 μL de meio Postgate B. *D. alaskensis* cultivada em meio Postgate C por 24 horas (DO_{600} inicial de 0,05) foi diluída e inoculada nos poços para uma concentração inicial de aproximadamente 10^5 UFC mL^{-1} . Todo o procedimento foi realizado em câmara de anaerobiose. Os poços das microplacas foram cobertos com um filme adesivo transparente (Axygen) para evitar a dispersão do H_2S e surgimento de falso positivo. A incubação foi realizada em câmara de anaerobiose por 48 horas a 30 $^\circ\text{C}$. O crescimento de *D. alaskensis* foi detectado pela observação de cor preta no meio de cultivo, causado pela precipitação de sulfeto ferroso. O resultado da inibição foi comparado ao obtido com o extrato bruto liofilizado (5 mg mL^{-1} em água destilada anaeróbia). Meio Postgate B inoculado com *D. alaskensis* e não inoculado foi utilizado como controle positivo e negativo do experimento, respectivamente. O experimento foi realizado com 3 repetições.

2.2.7. Termoestabilidade do extrato bruto de TR47II

A estabilidade térmica do extrato bruto de *B. subtilis* TR47II foi avaliada em termos de manutenção da atividade antimicrobiana contra *D. alaskensis* e capacidade de espalhamento de óleo, após ser submetido a tratamento térmico em diferentes temperaturas. Para isso, o extrato bruto liofilizado foi solubilizado em água destilada anaeróbia (5 mg mL^{-1}), filtrado (0,2 μm) e transferido para frascos de vidro. Os frascos foram lacrados com tampa de borracha e lacre de alumínio e em seguida foram incubados nas temperaturas de 40, 60 e 80 $^\circ\text{C}$ por 30 minutos e 12 horas, a 100 $^\circ\text{C}$ por 30 minutos e a 121 $^\circ\text{C}$ por 15 minutos. Após o tratamento térmico, a concentração mínima inibitória foi determinada (CMI) pelo método de susceptibilidade em microdiluições em meio Postgate B, como previamente descrito. A CMI foi definida como a menor concentração do extrato que inibiu completamente o crescimento de *D. alaskensis*. A CMI dos tratamentos foi comparada à obtida com o extrato bruto não tratado termicamente. O experimento foi realizado com três repetições.

O espalhamento de óleo foi realizado segundo método descrito por Morikawa *et al.* (2000), com modificações. Brevemente, 30 μL de petróleo foram

colocados na superfície de 100 mL de água destilada em uma placa de Petri (150 x 15 mm). Após formação de uma fina camada de óleo sobre a superfície da água, 10 µL da amostra foram aplicados no centro da camada de petróleo. A presença do biossurfactante provoca dispersão do petróleo, formando um halo claro cujo diâmetro foi medido após 30 segundos da aplicação, com auxílio de uma régua. O diâmetro do espalhamento de óleo dos tratamentos foi comparado ao obtido com o extrato bruto não-tratado. Os dados foram analisados por meio da análise de variância. O resultado foi expresso como a média \pm desvio padrão de três repetições.

2.2.8. *Extração independente do soxhlet*

Em decorrência da constatação da perda de atividade antimicrobiana do extrato bruto após a etapa de extração com soxhlet, uma metodologia de extração alternativa foi realizada em temperatura ambiente, visando manter-se a estabilidade da fração ativa contida no extrato bruto. Para isso, 0,2 g do extrato bruto liofilizado foi solubilizado em 150 mL de metanol e mantido sob agitação em agitador magnético por 24 horas. A amostra foi filtrada em papel-filtro quantitativo de filtragem rápida (\varnothing 12,5 cm; cód. 050154 Vetec) para retenção do precipitado insolúvel em metanol. O precipitado foi novamente extraído em metanol por 24 horas, filtrado, e o solvente das duas extrações foi evaporado em evaporador rotativo a 40 °C para obtenção do extrato metanólico.

2.2.9. *Ação antimicrobiana do extrato metanólico*

O extrato metanólico e o precipitado insolúvel em metanol (resíduo da extração), ambos a 5 mg mL⁻¹ em água destilada anaeróbia, foram avaliados contra *D. alaskensis* pelo método de susceptibilidade em microdiluições em meio Postgate B, conforme procedimento descrito anteriormente. O experimento foi realizado com três repetições.

2.2.10. *Bioautografia do extrato bruto e extrato metanólico*

Para confirmar a inibição contra *D. alaskensis* e investigar a presença de diferentes tipos de moléculas ativas, o extrato bruto liofilizado (Eb) e o extrato metanólico (Em) foram analisados por bioautografia (detecção cromatográfica da atividade antibacteriana), segundo Korenblum *et al.* (2012) com modificações. Aliquotas de 50 µL do Eb e Em (5 mg mL⁻¹ em metanol) foram aplicadas em

uma placa de CCD F₂₅₄ (80 x 40 mm) (Sigma-Aldrich). Outra placa CCD F₂₅₄ (80 x 40 mm) contendo o extrato metanólico (5 mg mL⁻¹, 50 µL) e os padrões comerciais (Sigma-Aldrich) dos lipopeptídeos surfactina, iturina A e fengicina A (1 mg mL⁻¹, 5 µL) foi utilizada como cromatograma de referência. As amostras foram eluídas com o sistema clorofórmio/metanol/água (80:25:3,5 v v⁻¹). Após completa evaporação dos solventes, as placas CCD foram deixadas sob luz UV por 20 minutos em cabine de segurança biológica e a placa CCD bioautográfica foi transferida para a câmara de anaerobiose. Alíquota da cultura de *D. alaskensis* cultivada em meio Postgate C por 24 horas (DO₆₀₀ inicial de 0,05) foi misturada a 25 mL de meio ágar (1,5 %) Postgate B fundido. A mistura contendo aproximadamente 10⁵ UFC mL⁻¹ foi toda vertida sobre a placa de CCD posicionada dentro de uma placa de Petri (90 x 15 mm), de modo que a placa CCD ficou completamente submersa no meio Postgate B. Após solidificação do meio de cultura, a placa de Petri foi mantida invertida em temperatura ambiente por 4 horas, para garantir a difusão dos componentes da placa CCD para o meio de cultura, e foi incubada em câmara de anaerobiose a 30 °C por 48 horas. Áreas claras de inibição foram observadas contra o fundo preto do meio de cultura, resultante da produção de H₂S e sua reação com o íon Fe²⁺ contido no meio de cultura. Para revelação da placa CCD de referência, a mesma foi mergulhada em solução de H₂SO₄ 15 % em etanol (v v⁻¹), o excesso escorrido, e a placa foi aquecida por aproximadamente 10 segundos utilizando um soprador térmico. Em seguida, a placa CCD foi mergulhada em solução de vanilina 5 % em etanol (m v⁻¹) e ácido sulfúrico 4 % (v v⁻¹), o excesso escorrido e aquecida utilizando soprador térmico por aproximadamente 15 segundos. A solução de vanilina ácida foi utilizada para intensificar a revelação. O fator de retenção (R_f) da fração ativa no extrato bruto e no extrato metanólico foi comparado ao dos padrões comerciais.

2.3. Resultados

2.3.1. Ação antimicrobiana dos extratos brutos de biossurfactantes

Dentre os isolados avaliados, quatro (50 %) produziram extratos contendo biossurfactantes com ação antimicrobiana contra a BRS *D. alaskensis*: *B. subtilis* TR12, *B. subtilis* TR22, *B. subtilis* TR35II e *B. subtilis* TR47II. No ensaio de

difusão em ágar, o extrato bruto obtido de *B. subtilis* TR47II apresentou o maior efeito antimicrobiano, com um halo médio de inibição de 21,6 mm (Figura 1, Tabela 3). TR22 e TR12 apresentam halos médios de 18,6 mm e 16,2 mm, respectivamente, e TR35II mostrou-se o menos eficiente (10,3 mm) (Figura 1). Destaca-se que todos os extratos continham biossurfactantes em concentração equivalente a 8 vezes a sua concentração micelar crítica (CMC). De acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade, houve diferença entre os valores médios de diâmetro do halo de inibição entre esses extratos (Tabela 3). O melhor efeito antimicrobiano contra *D. alaskensis* foi obtido com o extrato bruto de *B. subtilis* TR47II, sendo esse selecionado para avaliação da estabilidade térmica e investigação da molécula ativa.

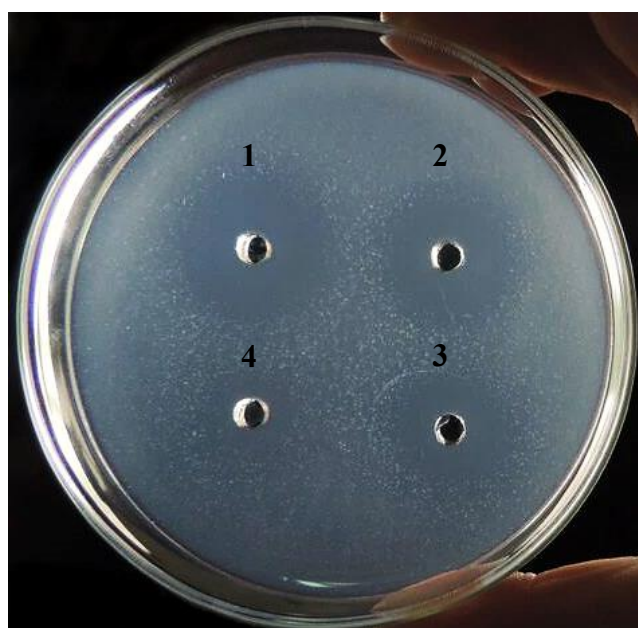


Figura 1. Atividade antimicrobiana dos biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* TR47II (1), *B. subtilis* TR22 (2), *B. subtilis* TR12 (3) e *B. subtilis* TR35II (4) contra a bactéria redutora de sulfato *D. alaskensis* (10^5 UFC mL⁻¹) cultivada em meio Postgate C. Aliquota de 20 μ L dos extratos brutos dos biossurfactantes (8 vezes a concentração micelar crítica) foi aplicada em poços de 5 mm de diâmetro e as placas foram incubadas a 30 °C por 6 dias em câmara de anaerobiose.

Tabela 3. Valores médios do diâmetro do halo de inibição contra *Desulfovibrio alaskensis* obtidos com os extratos brutos contendo biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* T47II, *B. subtilis* TR22, *B. subtilis* TR12 e *B. subtilis* TR35II

Extratos brutos	Diâmetro do halo de inibição (mm)
TR47II	21,62 ±2,96 a
TR22	18,58 ±1,88 b
TR12	16,16 ±1,71 c
TR35II	10,29 ±1,37 d

Os halos de inibição (mm) representam a média ± desvio padrão de 3 repetições. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

2.3.2. Purificação do extrato do soxhlet

Oitenta e nove frações de 7 mL cada, foram coletadas durante a purificação do extrato do soxhlet por cromatografia em coluna de sílica gel. Após a fração 89, foi utilizado metanol como fase móvel e o volume (60 mL) foi coletado em um único frasco.

O fator de retenção (R_f) dos componentes revelados nas placas de CCD foi utilizado como parâmetro para agrupar as frações coletadas da coluna em quatro frações principais: F1, F2, F3 e F4 (Figura 2). As frações de 4 a 51 foram reunidas em F1, as frações de 52 a 59 foram reunidas em F2, as de 60 a 89 foram reunidas em F3. O restante da eluição após a fração 89 foi coletado em F4. A fração F1 apresentou apenas uma mancha, com fator de retenção (R_f) de 0,86. F2 também apresentou única mancha, com R_f semelhante ao da surfactina disponível comercialmente (Sigma-Aldrich), $R_f = 0,72$. Em F3 foram observadas duas manchas, com valores de $R_f = 0,72$ e 0,60. Dentre os componentes da fração F4, foram observadas manchas que indicam R_f semelhantes aos dos padrões comerciais de iturina A ($R_f = 0,30$) e fengicina A ($R_f = 0,10$) (Sigma-Aldrich).

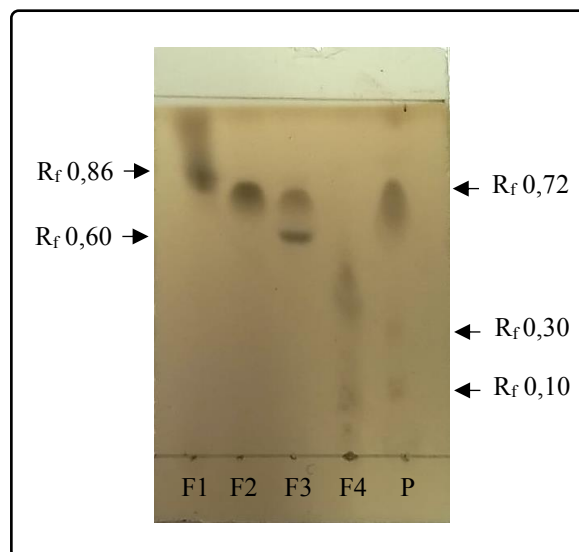


Figura 2. Cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato de *Bacillus subtilis* TR47II extraído em soxhlet. As frações do extrato foram purificadas por cromatografia em coluna e reunidas em F1, F2, F3 e F4 de acordo com o fator de retenção (R_f) após eluição em clorofórmio/metanol/água (65:25:4) e revelação com H_2SO_4 15 % em etanol (v/v). (P) Padrões comerciais de surfactina ($R_f=0,72$), iturina A ($R_f=0,30$) e fengicina A ($R_f=0,10$).

2.3.3. Investigação da fração ativa do extrato obtido com uso do soxhlet

No ensaio de susceptibilidade em microdiluições, não foi observada ação antimicrobiana do extrato obtido com uso do soxhlet (Figura 3). Isso indicou que *D. alaskensis* permaneceu ativa em todas as concentrações avaliadas. O mesmo foi observado para as frações purificadas em coluna cromatográfica (F1, F2, F3 e F4). No mesmo ensaio, o extrato bruto liofilizado (etapa anterior à separação por soxhlet) inibiu o crescimento de *D. alaskensis* a partir da concentração de $0,625 \text{ mg mL}^{-1}$. A ausência de inibição do extrato obtido com uso do soxhlet e das frações purificadas após essa etapa de extração indica uma possível degradação da molécula ativa do extrato de *B. subtilis* TR47II durante a extração por soxhlet. A perda da atividade antimicrobiana pode ter resultado do longo período de extração (12 horas) sob temperatura elevada (aproximadamente $70 \text{ }^\circ\text{C}$). Para comprovar esse efeito, foi realizada uma investigação da estabilidade térmica do extrato bruto e a adoção de um método alternativo de extração da molécula ativa em temperatura ambiente.

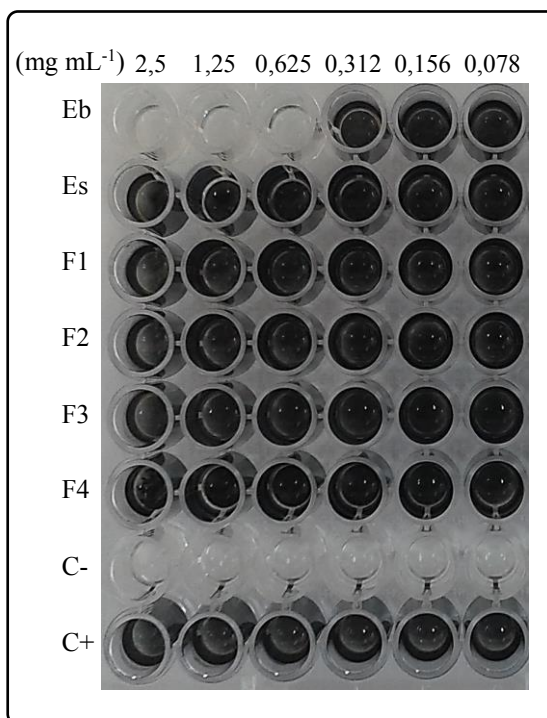


Figura 3. Investigação da fração ativa do extrato do soxhlet contra a bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio alaskensis* (10^5 UFC mL⁻¹). Microdiluições em meio Postgate B (100 μ L) foram realizadas a partir das soluções-estoque (5 mg mL⁻¹) de cada fração em microplaca de 96 poços. A incubação foi realizada a 30 °C por 48 horas em câmara de anaerobiose. Extrato bruto liofilizado (Eb), extrato do soxhlet (Es), frações do extrato do soxhlet separadas em coluna cromatográfica (F1, F2, F3 e F4), C- (meio Postgate B não inoculado), C+ (meio Postgate B inoculado com *D. alaskensis*). Poços com coloração preta indicam crescimento bacteriano e atividade de redução de sulfato.

2.3.4. Termoestabilidade do extrato bruto de *B. subtilis* TR47II

O extrato bruto liofilizado mantém a atividade antimicrobiana após ser submetido à temperatura de 40 °C por até 12 horas (Tabela 4). No entanto, há uma diminuição na atividade antimicrobiana com o aumento da temperatura e do tempo de exposição do extrato bruto a temperaturas acima de 40 °C. A 60 °C, a concentração mínima inibitória subiu de 1,25 mg mL⁻¹ (30 minutos) para 2,5 mg mL⁻¹ (12 horas). Após 12 horas de incubação a 80 °C e após autoclavagem do extrato bruto (121 °C por 15 minutos) não foi observada atividade antimicrobiana (CMI maior que 2,5 mg mL⁻¹).

Embora o extrato bruto de *B. subtilis* TR47II tenha apresentado diminuição da atividade antimicrobiana com o aumento da temperatura, as médias dos diâmetros de espalhamento de óleo foram muito semelhantes em todas as temperaturas avaliadas (Tabela 4). Mesmo após autoclavagem a 121 °C por 15

minutos, o diâmetro médio do espalhamento de óleo mostrou-se muito semelhante ao do extrato bruto não tratado, $4,76 \pm 0,23$ cm e $4,90 \pm 0,20$ cm respectivamente. Isso demonstra uma excelente termoestabilidade no espalhamento de óleo.

Tabela 4. Termoestabilidade do extrato bruto de *Bacillus subtilis* TR47II

	Concentração mínima inibitória (mg mL ⁻¹)		* Espalhamento de óleo (cm) $\bar{X} = \pm S_x$	
	30 min	12 horas	30 min	12 horas
Não tratado	0,625		4,90 ±0,20	
40 °C	0,625	0,625	4,46 ±0,15	4,70 ±0,17
60 °C	1,25	2,5	4,66 ±0,38	4,50 ±0,36
80 °C	1,25	>2,5	4,83 ±0,11	4,63 ±0,23
100 °C	2,5	nd	4,60 ±0,46	nd
121 °C/15 min	>2,5		4,76 ±0,23	

* Média do diâmetro do espalhamento de óleo ± desvio padrão. Efeito antimicrobiano e espalhamento de óleo não-determinados (nd).

2.3.5. Extração independente do soxhlet

A extração em metanol, dispensando-se o uso do soxhlet, manteve a integridade da molécula ativa do extrato de *B. subtilis* TR47II. A Figura 4 mostra o resultado da inibição do extrato metanólico e do resíduo da extração no ensaio de susceptibilidade em microdiluições no meio Postgate B. O extrato metanólico inibiu completamente o crescimento de *D. alaskensis* em concentrações tão baixas quanto $0,156$ mg mL⁻¹ e mostrou uma CMI de $0,312$ mg mL⁻¹. Nenhuma inibição foi observada com o resíduo retido no filtro após a extração, o que demonstra a eficiência do método de extração para recuperação da molécula ativa a partir do extrato bruto.

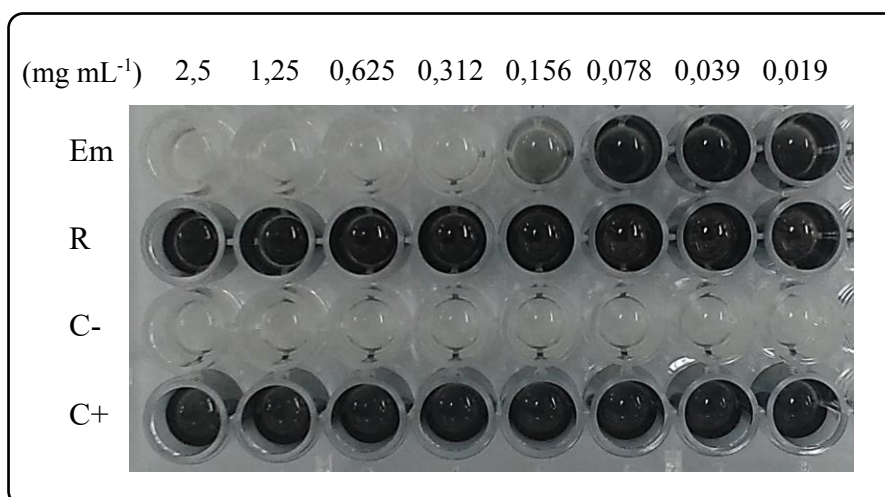


Figura 4. Ação antimicrobiana do extrato metanólico (Em) de *Bacillus subtilis* TR47II contra *Desulfovibrio alaskensis* (10^5 UFC mL⁻¹). Microdiluições em meio Postgate B (100 μ L) foram realizadas a partir das soluções-estoque (5 mg mL⁻¹) do extrato metanólico e do resíduo da extração (R) em microplaca de 96 poços. A incubação foi realizada a 30 °C por 48 horas em câmara de anaerobiose. C- (meio Postgate B não inoculado), C+ (meio Postgate B inoculado com *D. alaskensis*). Poços com coloração preta indicam crescimento bacteriano e atividade de redução de sulfato.

2.3.6. Bioautografia do extrato bruto e extrato metanólico

A bioautografia com o extrato bruto e o extrato metanólico de *B. subtilis* TR47II confirmou a inibição contra *D. alaskensis* e indicou apenas um componente ativo nos extratos (Figura 5). Após 48 horas de incubação em câmara de anaerobiose, apenas um halo claro foi observado nas linhas de migração das frações constituintes de ambos os extratos, contrastando com o fundo preto do meio Postgate B onde houve o crescimento de *D. alaskensis*. A fração ativa revelada por bioautografia apresentou fator de retenção ($R_f = 0,24$) semelhante ao do padrão comercial do lipopeptídeo iturina A ($R_f = 0,23$). Isso sugere que um lipopeptídeo semelhante à iturina, produzido por *B. subtilis* TR47II, seja a substância ativa contra *D. alaskensis*.

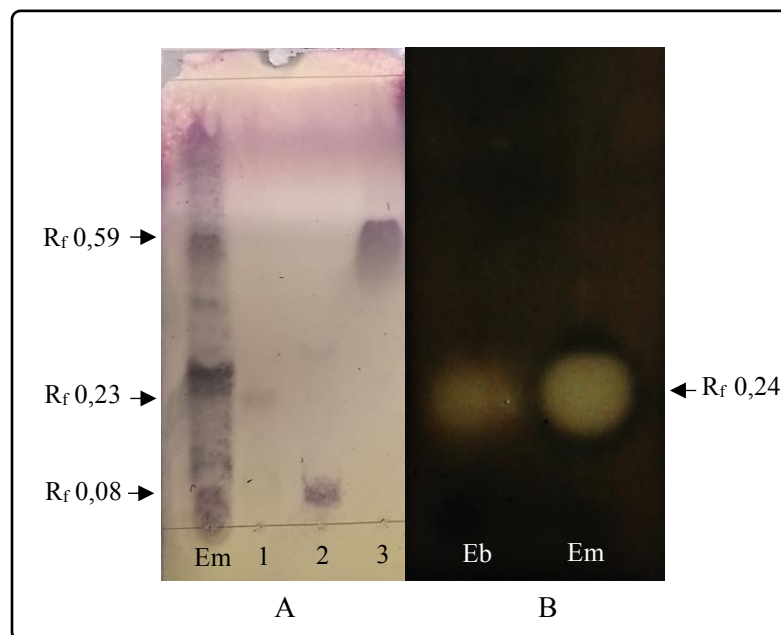


Figura 5. Atividade antimicrobiana do extrato de *Bacillus subtilis* TR47II revelada por bioautografia. (A) Cromatografia em camada delgada do extrato metanólico (Em) a 5 mg mL^{-1} e dos padrões comerciais (1 mg mL^{-1}) de iturina A (1), fengicina A (2) e surfactina (3), revelados com ácido sulfúrico e vanilina. (B) Bioautografia em meio Postgate B do extrato bruto (Eb) e Em a 5 mg mL^{-1} , demonstrando inibição do crescimento de *Desulfovibrio alaskensis* (10^5 UFC mL^{-1}) após 48 h de incubação a 30°C em câmara de anaerobiose. Fator de retenção (R_f) é indicado pelas setas.

2.4. Discussão

Biossurfactantes são moléculas amplamente estudadas, dentre outras características, por suas propriedades antimicrobianas (Gudiña *et al.*, 2010; Inès e Dhouha, 2015). Os biossurfactantes produzidos por bactérias do gênero *Bacillus* destacam-se como um dos mais potentes compostos antibacterianos, sendo efetivos até mesmo contra patógenos multi-resistentes (Shaligram e Singhal, 2010; Sriram *et al.*, 2011). Biossurfactantes produzidos por espécies desse gênero incluem diferentes lipopeptídeos, classificados principalmente na família das surfactinas, iturinas e fengicinas, os quais diferem no tipo e comprimento da cadeia de ácido graxo e nos aminoácidos da porção peptídica (Walia e Cameotra, 2015).

Neste trabalho, *B. subtilis* TR12, *B. subtilis* TR22, *B. subtilis* TR35II e *B. subtilis* TR47II produziram extratos brutos contendo biossurfactantes com ação antimicrobiana contra a bactéria redutora de sulfato *D. alaskensis*. Essas bactérias foram isoladas de solos da Ilha da Trindade e caracterizadas como produtoras de

biossurfactantes por Da Silva *et al.* (2015). Trindade é uma ilha oceânica brasileira de origem vulcânica, localizada no Atlântico Sul e distante 1.167 km da cidade de Vitória (ES) em direção à África. O estudo de Da Silva *et al.* (2015) foi o primeiro relato da produção de biossurfactantes por bactérias isoladas dessa ilha e criou a oportunidade de investigações adicionais com esses isolados por nosso grupo de pesquisas. Neste capítulo, nós relatamos pela primeira vez o efeito antimicrobiano de extratos brutos de biossurfactantes produzidos por isolados da Ilha da Trindade, com potencial aplicação na indústria do petróleo para o controle do crescimento de BRS.

Embora os extratos brutos de biossurfactantes de *B. subtilis* TR12, *B. subtilis* TR22, *B. subtilis* TR35II e *B. subtilis* TR47II tenham sido produzidos sob as mesmas condições de temperatura, pH e agitação, houve diferença no efeito antimicrobiano contra *D. alaskensis*. Uma vez que a composição do meio de produção variou quanto às fontes de carbono e nitrogênio fornecida para cada um dos isolados, isso pode ter influenciado na composição das moléculas produzidas (Liu *et al.*, 2012). Além disso, é preciso destacar que isolados diferentes da mesma espécie bacteriana produzem perfis distintos de moléculas de biossurfactantes, mesmo quando cultivados em condições similares (Vater *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2015), o que está relacionado com aspectos genéticos intrínsecos de cada isolado. Estudos têm demonstrado que o comprimento e a composição dos ácidos graxos da cadeia carbônica dos lipopeptídeos, bem como a composição de aminoácidos na sua porção peptídica, podem resultar em ação antimicrobiana variável (Liu *et al.*, 2012; Pathak e Keharia, 2014). Portanto, prováveis diferenças nas estruturas dos biossurfactantes, resultantes tanto das condições de cultivo quanto das especificidades de cada isolado bacteriano em termos de quais moléculas são produzidas, justificam as diferenças encontradas para a atividade antimicrobiana de seus extratos.

O extrato bruto produzido por *B. subtilis* TR47II foi o mais eficiente em inibir o crescimento de *D. alaskensis*. A atividade antimicrobiana desse extrato não foi alterada quando o mesmo foi mantido por até 12 horas a 40 °C. Em temperaturas mais elevadas, houve perda parcial ou nenhuma atividade antimicrobiana foi detectada, o que justifica a ausência de inibição após o extrato bruto passar pela etapa de extração em soxhlet. A temperatura mínima de

operação do soxhlet foi 64,7 °C, equivalente à temperatura de ebulição do metanol, o solvente utilizado na extração. Deduz-se que a alta temperatura de extração por um período prolongado (cerca de 12 horas), na presença de um solvente orgânico, provocou a perda da ação antimicrobiana do extrato bruto. Tal fato é reforçado pelo aumento significativo da CMI do extrato bruto quando o mesmo foi exposto a 60 °C por 12 horas, a qual passou de 0,625 mg mL⁻¹ para 2,5 mg mL⁻¹.

A extração por soxhlet é um método de extração sólido-líquido comumente utilizado em razão da facilidade de execução, baixo custo do aparato, alta eficiência de extração e dispensa da etapa de filtração da amostra após a extração (De Castro e Piegro-Capote, 2010). No entanto, o método não é adequado para compostos termicamente instáveis, uma vez que o aquecimento prolongado durante a extração pode levar à degradação dos compostos (Paiva *et al.*, 2004; Ncube *et al.*, 2008). No caso específico de biossurfactantes, é amplamente reconhecido que os mesmos são termicamente estáveis, mesmo quando submetidos a temperaturas tão altas quanto 100 °C (Chandankere, *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2016) ou mesmo à autoclavagem a 121 °C por 20 minutos (Chen *et al.*, 2012). Essa reconhecida termoestabilidade nos fez optar pelo uso do soxhlet como metodologia de extração nesse trabalho. No entanto, o extrato bruto de *B. subtilis* TR47II mostrou perda de atividade antimicrobiana com o aumento da temperatura, impossibilitando o uso desse método de extração.

De fato, a maioria dos relatos sobre estabilidade térmica de biossurfactantes focam em curtos períodos de avaliação, entre 15 minutos a 2 horas e relacionam a termoestabilidade somente com a manutenção das atividades de superfície - tensão superficial ou espalhamento de óleo -, e não com a atividade antimicrobiana. Liu *et al.* (2016) verificaram, a partir de medidas da tensão superficial, que o extrato de biossurfactante de *B. licheniformis* Y-1 manteve-se estável quando exposto a temperaturas entre 10 e 80 °C durante 2 horas. O mesmo foi observado para o sobrenadante do cultivo de *B. methylotrophicus* USTBa produtor de biossurfactante, que apresentou boa termoestabilidade entre 15 e 100 °C por 15 minutos (Chandankere *et al.*, 2014). Em nosso estudo, não houve diferença nos diâmetros de espalhamento de óleo do extrato bruto de *B. subtilis* TR47II nas temperaturas de 40 a 80 °C por até 12 horas, a 100 °C por 30 minutos,

e mesmo após autoclavagem a 121 °C por 15 minutos. No entanto, a termoestabilidade tensoativa não garantiu a termoestabilidade antimicrobiana. Os resultados obtidos neste estudo corroboram os de Ayed *et al.* (2014), que verificaram diminuição da atividade antimicrobiana do extrato de biossurfactante de *B. mojavensis* A21 com o aumento da temperatura. Esse biossurfactante manteve a atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* após ser exposto a temperaturas de 60, 70 e 80 °C por 15 minutos, havendo, no entanto, diminuição da atividade antimicrobiana quando a temperatura foi elevada para 90 e 100 °C por 15 minutos.

Em decorrência da perda de atividade antimicrobiana do extrato contra *D. alaskensis* após a etapa de extração com o soxhlet, optou-se por adotar um método alternativo de extração em metanol independente desse aparato, sob agitação e em temperatura ambiente. O extrato metanólico manteve ação antimicrobiana contra *D. alaskensis* e apresentou concentração mínima inibitória duas vezes menor que a do extrato bruto liofilizado. Além disso, nenhuma inibição foi observada com o resíduo dessa extração retido na etapa de filtração, confirmando a eficiência de extração da molécula ativa. A extração com metanol em temperatura ambiente tem sido utilizada para obtenção de lipopeptídeos de *B. subtilis* (Yang *et al.*, 2015), incluindo em trabalho de avaliação de sua atividade antibacteriana (Das *et al.*, 2008).

A confirmação da ação antimicrobiana do extrato metanólico contra *D. alaskensis* e a investigação da presença de diferentes tipos de moléculas ativas no extrato bruto foram realizadas por bioautografia. A bioautografia, ou detecção cromatográfica da ação antimicrobiana, é uma técnica antiga (Fischer e Lautner, 1961), mas ainda muito útil para se detectarem quais são os componentes ativos de uma amostra contendo uma mistura de moléculas distintas. Por ser uma técnica simples, rápida e de baixo custo, ela tem sido utilizada para detecção e isolamento de moléculas ativas contra diversos microrganismos (Choma e Grzelak, 2011; Dewanjee *et al.*, 2015; Kovács, *et al.*, 2016). Korenblum *et al.* (2012) utilizaram a bioautografia para verificar a inibição do extrato de *Bacillus* sp. H2O-1 contra *D. alaskensis* NCIMB 13491. Áreas claras de inibição na placa CCD, referentes à ação de moléculas de surfactina, foram verificadas após 7 dias de incubação em câmara de anaerobiose. Neste trabalho, nós adaptamos a metodologia e

confirmamos a ação antimicrobiana do extrato de *B. subtilis* TR47II contra *D. alaskensis* em apenas 48 horas de incubação. A bioautografia com o extrato de *B. subtilis* TR47II foi também avaliada adotando-se períodos de incubação de 4 e 6 dias (resultados não-apresentados). No entanto, nenhuma área clara de inibição adicional foi verificada nas placas CCD bioautográficas, optando-se por isso pela utilização do menor tempo (48 horas) para avaliação do efeito antimicrobiano contra essa espécie bacteriana.

A área clara de inibição correspondente ao extrato bruto e ao extrato metanólico de *B. subtilis* TR47II apresentou um fator de retenção semelhante ao do padrão comercial de iturina A, indicando que provavelmente um lipopeptídeo da família das iturinas seja a molécula ativa contra *D. alaskensis*. Segundo nosso conhecimento, não há relatos da ação antimicrobiana de iturinas contra BRS. Os resultados apresentados neste trabalho indicam a possibilidade de um novo lipopeptídeo com potencial de aplicação para inibição de BRS na indústria do petróleo.

2.5. Conclusões

Neste estudo, quatro extratos brutos de biossurfactantes, obtidos de *B. subtilis* isolados da ilha da Trindade, mostraram ação antimicrobiana contra a BRS *D. alaskensis* NCIMB 13491. Dentre esses isolados, *B. subtilis* TR47II foi o mais efetivo. A bioautografia do extrato de *B. subtilis* TR47II indicou que provavelmente a molécula ativa é um lipopeptídeo da família das iturinas. Os resultados obtidos incentivam esforços para purificação e caracterização estrutural de um novo lipopeptídeo ativo contra BRS.

2.6. Referências

- Ayed, H.B., Hmidet, N., Béchet, M., Chollet, M., Chataigné, G., Leclère, V., Jacques, P., Nasri, M. 2014. Identification and biochemical characteristics of lipopeptides from *Bacillus mojavensis* A21. *Process Biochemistry*, 49, 1699–1707.
- Banat, I.M., Franzeti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J., Marchant, R. 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 427–444.
- Chandankere, R., Yao, J., Cai, M., Masakorala, K., Jain, A.K. Martin, Choi, M.M.F. 2014. Properties and characterization of biosurfactant in crude oil biodegradation by bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa. *Fuel*, 122, 140–148.
- Chen, W.C., Juang, R.S., Wei, Y.H., 2015. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 103, 158–169.
- Chen, Y-C., Chiang, T-J., Liang, T-W., Wang, I-L., Wang, S-L. 2012. Reclamation of squid pen by *Bacillus licheniformis* TKU004 for the production of thermally stable and antimicrobial biosurfactant. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1, 62–69.
- Choma, I.M., Grzelak, E.M., 2011. Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 19, 2684–2691.
- Da Silva, F.S.P., Pylro, V.S., Fernandes, P.L., Barcelos, G.S., Kalks, K.H.M., Schaefer, C.E.G.R., Tótola, M.R., 2015. Unexplored Brazilian oceanic island host high salt tolerant biosurfactant-producing bacterial strains. *Extremophiles*, 19, 561–572.
- Das, P., Mukherjee, S., Sen, R., 2008. Antimicrobial potential of lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1675-1684.
- De Castro, L.M.D., Priego-Capote, F. 2010. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2383–2389.
- Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., Bhattacharya, N., Khanra, R., Dua, T.K. 2015. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5, 75–84.
- Enning, D., Garrelfs, J., 2014. Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria: new views of an old problem. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 1226-1236.
- Faria, A.F., Martinez, D.S.T., Barbosa, G.N.O., Vaz, B.G., Silva, I.S., Garcia, J.S., Tótola, M.R., Eberlin, M.N., Grossman, M., Alves, O.L., Durrant, L.R., 2011. Production and structural characterization of surfactin (C₁₄/Leu₇) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. *Process Biochemistry*, 46, 1951-1957.
- Feio, M.J., Zinkevich, V., Beech, I.B., Llobet-Brossa, E., Eaton, P., Schmitt, J., Guezennec, J., 2004. *Desulfovibrio alaskensis* sp. Nov., a sulphate reducing bacterium from a soured oil reservoir. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*, 54, 1747–1752.
- Fischer, R., Lautner, H., 1961. On the paper chromatographic detection of penicillin preparations. *Archiv der Pharmazie*, 294/66, 1–7.

Gana, M.L., Kebbouche-Gana, S., Touzi, A., Zorgani, M.A., Paus, A., Lounici, H., Mameri, N. 2011. Antagonistic activity of *Bacillus* sp. obtained from an Algerian oilfield and chemical biocide THPS against sulfate-reducing bacteria consortium inducing corrosion in the oil industry. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38, 391–404.

Gieg, L.M., Jack, T.R., Foght, J.M., 2011. Biological souring and mitigation in oil reservoirs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 263–282.

Gudiña, E.J., Rocha, V., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R., 2010. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* A20. *Letters in Applied Microbiology*, 50, 419-424.

Hasegawa, R., Toyama, K., Miyana, K., Tanji, Y., 2014. Identification of crude-oil components and microorganisms that cause souring under anaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 1853–1861.

Inès, M., Dhouha, G., 2015. Glycolipid biosurfactants: potential related biomedical and biotechnological applications. *Carbohydrate Research*, 416, 59–69.

Korenblum, E., Araujo, L.V., Guimarães, C.C.R., Souza, L.M., Sasaki, G., Abreu, F., Nitschke, M., Lins, U., Freire, D.M.G., Barreto-Bergter, E., Seldin, L., 2012. Purification and characterization of a surfactin-like molecule produced by *Bacillus* sp. H2O-1 and its antagonistic effect against sulfate reducing bacteria. *BMC Microbiology*, 12, 1-13.

Kovács, J.K., Horváth, G., Kerényi, M., Kocsis B., Emődy, L., Schneider, G. 2016. A modified bioautographic method for antibacterial component screening against anaerobic and microaerophilic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 123, 13–17.

Lima, T.M.S., Procópio, L.C., Brandão, F.D., Carvalho, A.M.X., Tótola, M.R., Borges, A.C., 2011b. Biodegradability of bacterial surfactants. *Biodegradation*. 22, 585-592.

Lima, T.M.S., Procópio, L.C., Brandão, F.D., Leão, B.A., Tótola, M.R., Borges, A.C., 2011a. Evaluation of bacterial surfactant toxicity towards petroleum degrading microorganisms. *Bioresource Technology*, 102, 2957-2964.

Liu, X., Ren, B., Gao, H., Liu, M., Dai, H., Song, F., Yu, Z., Wang, S., Hu, J., Kokare, C.R., Zhang, L., 2012. Optimization for the production of surfactin with a new synergistic antifungal activity. *PLOS ONE*, 7, 1-9.

Liu. B., Liu, J., Jua, M., Li, X., Yu, O. 2016. Purification and characterization of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* Y-1 and its application in remediation of petroleum contaminated soil. *Marine Pollution Bulletin*, 107, 46–51.

Marchant, R., Banat, I.M., 2012. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in Biotechnology*, 30, 558-565.

Meena, K.R., Kanwar, S.S. 2015. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *BioMed Research International*, 2015, 1-10.

Mnif, I., Ghribi, D., 2015. Review-Lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for industrial, biomedical environmental applications. *Journal of Peptide Science* 104, 129-147.

- Morikawa, M., Hirata, Y., Imanaka, T. 2000. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1488, 211-218.
- Nanda, A., Saravanan, M., 2009. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 5, 452-456.
- Ncube, N.S., Afolayan, A.J., Okoh, A.I. 2008. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*, 7, 1797-1806.
- Paiva, S.R., Lima, L.A., Figueiredo, M.R., Kaplan, M.A.C. 2004. Plumbagin quantification in roots of *Plumbago scandens* L. obtained by different extraction techniques. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 76, 499-504.
- Pathak, K.V., Keharia, H., 2014. Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist, *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) tree using mass spectrometry. *3 Biotech*, 4, 283-295.
- Postgate, J.R., 1984. *The sulphate-reducing bacteria*, second ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Raaijmakers, J.M., Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M. 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 1037-1062.
- Reiffenstein, R.J, Hulbert, W.C., Roth, S.H., 1992. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual Review Pharmacology and Toxicology*, 32, 109-134.
- Shaligram, N.S., Rekha S. Singhal, R.S., 2010. Surfactin – a review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 119-134.
- Sriram, M.I., Kalishwaralal, K., Deepak, V., Gracerosepat, R., Srisakthi, K., Gurunathan, S., 2011. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. *Colloids and Surface B Biointerfaces*, 85, 174-181.
- Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P. 2006. Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances*, 24, 604-620.
- Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N., Cameotra, S.S., 2002. Matrix-assisted 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*, 68, 6210-6219.
- Walia, N.K., Cameotra, S.S., 2015. Lipopeptides: biosynthesis and applications. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 7, 103-107.
- Xu, D., Gu, T., 2015. The war against problematic biofilms in the oil and gas industry. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 7, 1-2.

Yang, H., Li, X., Li, X., Yu, H., Shen, Z., 2015. Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and surfactin by RP-HPLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 2529–2542.

Capítulo 3

Coprodução de lipopeptídeos por Bacillus subtilis TR47II e ação antimicrobiana contra a bactéria redutora de sulfato Desulfovibrio alaskensis

Coprodução de lipopeptídeos por *Bacillus subtilis* TR47II e ação antimicrobiana contra a bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio alaskensis*

Resumo

Bacillus subtilis TR47II, isolado da Ilha oceânica da Trindade, produz um lipopeptídeo da família das iturinas com ação antimicrobiana contra a bactéria redutora de sulfato (BRS) *Desulfovibrio alaskensis* NCIMB 13491. A produção de biossurfactante por *B. subtilis* TR47II foi avaliada pela medida da tensão superficial do meio de cultivo, espalhamento de óleo e rendimento de extrato bruto de biossurfactante em meio mineral contendo sacarose como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Nesse meio de cultivo, *B. subtilis* TR47II produz biossurfactantes compreendendo as principais famílias de lipopeptídeos: surfactinas, iturinas e fengicinas. Espectrometria de massas por ionização/dessorção a laser assistida por matriz com análise do tempo de voo (MALDI-TOF/TOF-MS e MS/MS) foi utilizada para caracterizar os lipopeptídeos das frações purificadas por cromatografia em coluna. A detecção da ação antimicrobiana por bioautografia mostrou uma fração ativa contra *D. alaskensis* com fator de retenção semelhante ao do padrão comercial de iturina A. A análise por MALDI-TOF/TOF da fração ativa mostrou picos com m/z 1043 e 1057 referentes a prováveis moléculas de iturinas e m/z 1463 referente a provável lipopeptídeo fengicina. Na fração não-ativa foram detectados homólogos de surfactina com m/z 1030, 1044, 1058 e 1072, com a sequência peptídica Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu e cadeia lateral C₁₃, C₁₄, C₁₅ e C₁₆ β -hidroxi ácido graxo, respectivamente.

Palavras-chave: biossurfactante, *Bacillus subtilis*, ação antimicrobiana, bactéria redutora de sulfato, indústria do petróleo.

3.1. Introdução

Bactérias redutoras de sulfato (BRS) são consideradas o principal grupo de microrganismos associados a diversos problemas na indústria do petróleo, decorrentes principalmente da produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S). O *souring* biogênico, como é conhecida a produção de H₂S por BRS, é um problema antigo na indústria de petróleo, e que até hoje tem sido o foco de diversas pesquisas com o intuito de se desenvolver métodos de prevenção e controle (Johnson *et al.*, 2017).

BRS constituem um grupo de microrganismos anaeróbios que são capazes de oxidar vários compostos orgânicos utilizando principalmente o sulfato como acceptor final de elétrons, resultando na produção de H₂S (Muyzer e Stams 2008). Na indústria do petróleo, o crescimento de BRS está associado ao processo de recuperação secundária do petróleo (Gieg *et al.*, 2011). Durante esse processo, água do mar é frequentemente utilizada para restaurar a pressão interna de reservatórios *offshore* e aumentar a vazão do petróleo. A injeção de água do mar, rica em sulfato, estimula o crescimento de BRS, as quais podem ainda formar biofilmes nas instalações, o que dificulta o seu controle (Gieg *et al.*, 2011).

A concentração de sulfato introduzida nos reservatórios depende da fonte da água de injeção, a qual pode ser bastante elevada (aproximadamente 30 mmol L⁻¹) em operações *offshore*. Considerando que grandes volumes de água do mar são injetados durante o processo, tipicamente 10.000 m³ por dia, dependendo do reservatório, grandes quantidades de sulfeto de hidrogênio podem ser produzidas (acima de 1.100 kg/dia) (Hubert e Voordouw, 2007). Embora o H₂S possa ser produzido quimicamente pela dissolução dos sulfetos metálicos da rocha nos reservatórios, a maior parte do H₂S é produzido pela atividade metabólica de BRS (Mougin *et al.*, 2007).

O *souring* biogênico impacta negativamente a indústria do petróleo de diversas maneiras. O H₂S é um gás tóxico, corrosivo e inflamável, e ainda apresenta forte odor desagradável, o que gera problemas de segurança e à saúde dos trabalhadores (Reiffenstein *et al.*, 1992, Tang *et al.*, 2009). Além disso, o H₂S diminui a qualidade do óleo extraído e pode provocar entupimento dos reservatórios decorrente da precipitação de sulfeto de ferro e, como consequência, aumenta os custos de produção do petróleo (Gieg *et al.*, 2011).

Diversas estratégias são utilizadas para prevenção e controle do *souring* na indústria do petróleo, como a remoção de sulfato da água de injeção, uso de inibidores do crescimento de BRS como nitrato e molibdato e utilização de biocidas (Elmawgoud *et al.*, 2015). O uso de biocidas tem sido a principal estratégia para o controle de BRS, e investigações de novas moléculas ativas têm sido incentivadas em razão da seleção de BRS resistentes aos biocidas tradicionalmente utilizados (Xu e Gu, 2015).

Lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* sp. são reconhecidos como agentes antimicrobianos bastante eficientes contra uma diversidade de microrganismos (Shaligram e Singhal, 2010; Sriram *et al.*, 2011). Essas moléculas são tensoativos constituídos de um peptídeo cíclico ligado a uma cadeia de ácido graxo (Meena e Kanwar, 2015). Surfactinas, iturinas e fengicinas são as principais famílias de lipopeptídeos produzidas e são separadas de acordo com a variação no tipo e tamanho da cadeia de ácido graxo e com a composição e tamanho da cadeia peptídica (Meena e Kanwar, 2015). Esses lipopeptídeos apresentam características que são desejáveis para aplicação na indústria do petróleo, como baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, amplo espectro de ação antimicrobiana e possibilidade de serem produzidos a partir de resíduos da agroindústria, o que diminui os custos de produção (Faria *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2011; Sahnoun *et al.*, 2014).

No capítulo 2 deste trabalho nós verificamos que *B. subtilis* TR47II, isolado da Ilha da Trindade (Da Silva *et al.*, 2015), produz um extrato de biossurfactante com a maior ação antimicrobiana contra a BRS *Desulfovibrio alaskensis* NCMB 13491 dentre oito extratos de *Bacillus* sp. avaliados. O estudo indicou ainda a possibilidade de um lipopeptídeo da família das iturinas ser a molécula ativa do extrato bruto. Após buscas na literatura disponível, não foram encontrados relatos da ação antimicrobiana de iturinas contra BRS. Considerando esse fato e as características do local de isolamento da bactéria, uma ilha oceânica, acreditamos que pode se tratar de uma nova molécula ativa contra BRS. Por isso, no presente estudo, nosso objetivo principal foi purificar e caracterizar quimicamente a fração ativa do extrato de *B. subtilis* TR47II.

3.2. Materiais e métodos

3.2.1. Microrganismos e condições de cultivo

B. subtilis TR47II foi reativado em meio ágar triptona de soja (TSA-Difco) e incubado por 24 horas sob temperatura de 30 °C. A cultura foi mantida a 4 °C, sendo repicada mensalmente no mesmo meio de cultivo. A bactéria redutora de sulfato *D. alaskensis* NCIMB 13491 (Feio *et al.*, 2004) foi mantida a 30 °C em meio anaeróbio Postgate C (Postgate 1984) contendo (g L⁻¹): KH₂PO₄ (0,5), NH₄Cl (1,0), NaCl (25,0), Na₂SO₄ (4,5), CaCl₂.6H₂O (0,06), MgSO₄.6H₂O (0,06), C₆H₅Na₃O₇.2H₂O (0,1), extrato de levedura (1,0), lactato de sódio 50 % p v⁻¹ (9,4 mL), FeSO₄.7H₂O (0,004), tioglicolato de sódio (0,1), resazurina 0,25 % (4,0 mL); pH 7,5.

3.2.2. Crescimento e produção de biossurfactantes por *B. subtilis* TR47II

B. subtilis TR47II foi cultivado a 30 °C e 200 rpm por 5 dias, em frasco Erlenmeyer de 1 L contendo 0,5 L do meio mineral (g L⁻¹): K₂HPO₄ (13,9), KH₂PO₄ (2,7), extrato de levedura (0,05), NH₄SO₄ (1,65); pH 7,0. O meio foi suplementado após autoclavagem (121 °C, 15 minutos) com solução de sacarose (20 g L⁻¹) e de micronutrientes (50 mL L⁻¹) (g L⁻¹): EDTA (0,5), MgSO₄.7H₂O (3,0), MnSO₄.H₂O (0,5), NaCl (1,0), CaCl₂.2H₂O (0,1), CoCl₂.6H₂O (0,1), ZnSO₄.7H₂O (0,1), FeSO₄.7H₂O (0,1), CuSO₄.5H₂O (0,01), Na₂MoO₄.2H₂O (0,01), Na₂O₄Se (0,01), Na₂WO₄.2H₂O (0,01), NiCl₂.6H₂O (0,02). O ajuste da densidade óptica inicial a 600 nm (DO₆₀₀ = 0,05) foi realizado após centrifugação (10.000 g por 15 minutos) e lavagem das células (NaCl 8,5 g L⁻¹) crescidas por 24 horas em MM contendo glicose (20 g L⁻¹) e NH₄NO₃ (1,0 g L⁻¹).

Alíquotas foram retiradas do meio de cultivo em diferentes tempos até 120 horas de incubação para verificação do pH, leitura da DO_{600nm} e verificação da produção de biossurfactante pela medida da tensão superficial, espalhamento do óleo e rendimento de extrato bruto de biossurfactante. Para avaliação da produção de biossurfactantes, as células foram removidas por centrifugação a 10.400 g por 15 minutos. A tensão superficial foi determinada pelo método da placa Wilhelmy em tensiômetro Dataphysics modelo DCAT 11EC. Os dados foram obtidos usando o software SCAT v.3.2.0.84. O espalhamento de óleo foi realizado segundo método descrito por Morikawa *et al.*, (2000), com

modificações. Brevemente, 30 μL de petróleo foram colocados na superfície de 100 mL de água destilada em uma placa de Petri (150 x 15 mm). Após formação de uma película de óleo sobre a superfície da água, 10 μL da amostra foram aplicados no centro da camada de óleo. A presença do biossurfactante provoca dispersão do óleo, resultando na formação de um halo claro cujo diâmetro foi medido após 30 segundos da aplicação.

O experimento foi conduzido segundo o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com oito tempos de avaliações e três repetições do experimento. Os dados foram analisados por meio de análise de regressão das variáveis $\text{DO}_{600\text{nm}}$, pH, tensão superficial, espalhamento de óleo e rendimento bruto de biossurfactante em função do tempo de cultivo. Os modelos foram escolhidos com base na significância dos coeficientes de regressão utilizando o teste “t” e adotando-se o nível de 5 % de probabilidade. A escolha dos modelos foi ainda baseada no coeficiente de determinação e no comportamento das variáveis em estudo.

3.2.3. Obtenção do extrato bruto dos biossurfactantes de *B. subtilis* TR47II

O extrato bruto contendo biossurfactantes foi obtido por precipitação ácida, segundo método descrito por Vater *et al.*, (2002). As células foram removidas do meio de cultivo por centrifugação (10.400 g, 15 minutos, 4 °C), o sobrenadante foi recolhido e o pH ajustado para 2,0 utilizando-se HCl 6 mol L⁻¹. Após incubação a 4 °C *overnight*, o biossurfactante precipitado foi recuperado por centrifugação (10.400 g, 20 minutos, 4 °C) e dissolvido em água destilada, ajustando-se o pH da solução para 7,0. A amostra foi liofilizada por 24 horas e mantida a 4 °C. O rendimento de produção de biossurfactantes (g L⁻¹) foi determinado por meio da massa do produto liofilizado.

3.2.4. Extração e purificação dos biossurfactantes produzidos por *B. subtilis* TR47II

Aproximadamente 0,2 g de extrato bruto liofilizado foi extraído com metanol (150 mL) sob agitação em agitador magnético por 24 horas. A amostra foi filtrada em papel-filtro quantitativo de filtragem rápida (\varnothing 12,5 cm; cód. 050154 Vetec) para retenção do precipitado insolúvel em metanol. O precipitado foi novamente extraído em metanol por 24 horas, filtrado e o solvente das duas

extrações foi evaporado em evaporador rotativo a 40 °C para obtenção do extrato metanólico seco.

Para purificação, o extrato metanólico foi aplicado em coluna cromatográfica (26 x 5,0 cm) de sílica gel 60 (70-230 mesh, Sigma-Aldrich) e eluído com aproximadamente 800 mL de clorofórmio/metanol/água nas proporções de 80:25:3,5 e 65:25:4 (v v⁻¹) sequencialmente. As frações coletadas foram analisadas por cromatografia em camada delgada F₂₅₄ (CCD; 40 x 25 mm; Sigma-Aldrich), eluídas com clorofórmio/metanol/água (65:25:4). Para revelação dos componentes eluídos nas placas CCD, as mesmas foram mergulhadas em solução de H₂SO₄ 15 % em etanol (v v⁻¹), o excesso escorrido, e as placas foram aquecidas por aproximadamente 15 segundos utilizando um soprador térmico. As frações com fator de retenção (R_f) semelhantes foram agrupadas e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo a 40 °C.

3.2.5. Espectrometria de massas por ionização/dessorção a laser assistida por matriz com análise do tempo de voo (MALDI-TOF/TOF-MS e -MS/MS)

Análise por MALDI-TOF/TOF foi utilizada para determinar a massa e elucidar a estrutura do lipopeptídeo ativo contra *D. alaskensis* e de outros lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis* TR47II. As frações principais purificadas por CCD foram solubilizadas em etanol (Sigma-Aldrich) em concentração de 2,5 mg mL⁻¹. Os padrões comerciais dos lipopeptídeos surfactina, iturina A e fengicina A (Sigma-Aldrich) foram utilizados em concentração de 1,0 mg mL⁻¹ em etanol (Sigma-Aldrich). A matriz utilizada foi o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico – HCCA (Bruker Daltonics, Alemanha), solubilizado na solução de acetonitrila 50 %, acidificada com ácido trifluoracético 0,1 % (v v⁻¹), para uma concentração final de 10 mg mL⁻¹. Para calibração do método de análise MS, foram utilizados peptídeos padrões (Peptide Calibration Standard II) (Bruker Daltonics, Alemanha). Em seguida, 1 μ L de amostra e 1 μ L de matriz foram aplicados e homogeneizados em cada *spot* da placa de aço apropriada para análise. Os espectros de MS e MS/MS foram adquiridos em espectrômetro MALDI-TOF/TOF, modelo Ultraflex III (Bruker Daltonics).

Para obtenção dos dados de MS, utilizou-se o modo refletivo e positivo, com uma faixa de detecção de 500 a 3400 Da. Para a realização de MS/MS, foi utilizado o método LIFT no modo positivo, para o qual foram selecionados os

íons com maior intensidade em relação à razão massa/carga (m/z). Todos os dados obtidos foram gerenciados pelo *software* Flexcontrol, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha), e os espectros resultantes das análises MS e MS/MS foram processados com o auxílio do aplicativo FlexAnalysis, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha). Os espectros foram analisados manualmente, verificando-se a diferença entre picos para se encontrar uma sequência candidata para os lipopeptídeos. O sequenciamento foi baseado na semelhança com os espectros dos padrões comerciais dos lipopeptídeos e em informações obtidas em relato previamente descrito (Yang *et al.*, 2015).

3.2.6. Investigação da fração ativa e determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

As frações principais purificadas foram avaliadas contra *D. alaskensis* pelo método de susceptibilidade em microdiluições no meio Postgate B (Postgate, 1984), contendo (g L^{-1}): KH_2PO_4 (0,5), NH_4Cl (1,0), NaCl (25,0), Na_2SO_4 (1,0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,0), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1), extrato de levedura (1,0), lactato de sódio 50 % m v^{-1} (7,0 mL), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), tioglicolato de sódio (0,1), ácido ascórbico (0,1), pH 7,5. As frações foram solubilizadas em água destilada anaeróbia (5 mg mL^{-1}) e esterilizadas por filtração ($0,2 \mu\text{m}$) em câmara de anaerobiose. Aliquotas de $100 \mu\text{L}$ foram transferidas para o primeiro poço de uma microplaca de 96 poços (Nest) contendo $100 \mu\text{L}$ de meio Postgate B (duas vezes concentrado). A solução foi serialmente diluída duas vezes, transferindo-se $100 \mu\text{L}$ da diluição anterior para o poço seguinte contendo $100 \mu\text{L}$ de meio Postgate B. *D. alaskensis* cultivada em meio Postgate C por 24 horas (DO_{600} inicial de 0,05) foi diluída e inoculada nos poços para uma concentração inicial de aproximadamente 10^5 UFC mL^{-1} . Todo o procedimento foi realizado em câmara de anaerobiose.

Os poços das microplacas foram cobertos com um filme adesivo transparente (Axygen) para evitar a dispersão do H_2S e surgimento de falso positivo. A incubação foi realizada em câmara de anaerobiose por 48 horas a 30°C . O crescimento de *D. alaskensis* foi detectado pela observação de cor preta no meio de cultivo, causado pela precipitação de sulfeto ferroso. A CMI foi determinada como a menor concentração da fração em que não houve crescimento (formação de precipitado preto). A inibição promovida pela fração ativa foi

comparada à obtida com o extrato bruto liofilizado e o extrato metanólico na mesma concentração estoque (5 mg mL⁻¹ em água destilada). Meio Postgate B inoculado com *D. alaskensis* (10⁵ UFC mL⁻¹) e não-inoculado foram utilizados como controles positivo e negativo do experimento, respectivamente. O experimento foi realizado com 3 repetições.

3.2.7. Bioautografia das frações purificadas

O procedimento de bioautografia foi realizado segundo Korenblum *et al.*, (2012), com modificações. Aliquotas de 50 µL (5 mg mL⁻¹ em metanol) do extrato metanólico e da fração ativa foram aplicadas em uma placa de CCD F₂₅₄ (80 x 40 mm) (Sigma-Aldrich). Outra placa CCD F₂₅₄ (80 x 40 mm) contendo a fração ativa (5 mg mL⁻¹, 50 µL) e os padrões comerciais (Sigma-Aldrich) dos lipopeptídeos surfactina, iturina A e fengicina A (1 mg mL⁻¹, 5 µL) foi utilizada como cromatograma de referência. As amostras foram eluídas com o sistema clorofórmio/metanol/água (80:25:3,5 v v⁻¹). Após completa evaporação dos solventes, as placas CCD foram deixadas sob luz UV por 20 minutos em cabine de segurança biológica e a placa CCD bioautográfica foi transferida para câmara de anaerobiose. Aliquota da cultura de *D. alaskensis* cultivada em meio Postgate C por 24 horas (DO₆₀₀ inicial de 0,05) foi misturada a 25 mL de meio ágar (1,5 %) Postgate B fundido. A mistura contendo aproximadamente 10⁵ UFC mL⁻¹ foi vertida de modo a cobrir completamente a placa de CCD posicionada dentro de uma placa de Petri (90 x 15 mm). Após solidificação do meio de cultura, a placa de Petri foi mantida invertida em temperatura ambiente por 4 horas e incubada em câmara de anaerobiose a 30 °C por 28 horas. Áreas claras de inibição foram observadas contra o fundo preto do meio de cultura. Para revelação da placa CCD de referência, a mesma foi mergulhada em solução de H₂SO₄ 15 % em etanol (v v⁻¹), o excesso escorrido, e a placa foi aquecida por aproximadamente 10 segundos utilizando um soprador térmico. Em seguida, a placa CCD foi mergulhada em solução de vanilina 5 % em etanol (m v⁻¹) e ácido sulfúrico 4 % (v v⁻¹), o excesso escorrido e aquecida utilizando soprador térmico por aproximadamente 15 segundos. O fator de retenção (R_f) da fração ativa foi comparado ao dos padrões comerciais.

3.3. Resultados

3.3.1. Crescimento e produção de biossurfactantes por *B. subtilis* TR47II

B. subtilis TR47II foi cultivado por 5 dias a 30 °C e 200 rpm em 0,5 L de meio mineral contendo sacarose como fonte de carbono. O comportamento das variáveis $\ln(\text{DO}_{600\text{nm}})$, pH, tensão superficial, espalhamento de óleo e rendimento de extrato bruto de biossurfactante em função do tempo de incubação é apresentado na Figura 1.

B. subtilis TR47II apresentou crescimento acentuado nas primeiras 9 horas de incubação, caracterizando a fase exponencial de crescimento (Figura 1A). O valor de $\ln(\text{DO}_{600\text{nm}})$ atingiu o máximo em cerca de 9 horas de cultivo e manteve-se constante até o final do tempo de incubação, caracterizando a fase estacionária de crescimento. O pH do meio de cultivo apresentou um declínio acentuado até um valor mínimo de 6,3 em 42 horas de incubação, aumentando lentamente a partir desse ponto (Figura 1B).

Bons surfactantes são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 para valores iguais ou menores do que 35 mN m^{-1} (Santos *et al.*, 2016). Nesse trabalho, a tensão superficial do meio mineral ($72,73 \text{ mN m}^{-1}$) apresentou uma queda acentuada até 6,5 horas de cultivo, no qual atingiu o valor mínimo de $29,44 \text{ mN m}^{-1}$ (Figura 1C), mantendo-se nesse valor ao longo do restante do período de incubação. O resultado permite concluir que a concentração de biossurfactantes no meio de crescimento, já em 6,5 horas de incubação, era igual ou superior à concentração micelar crítica. Além disso, mostra que a produção de biossurfactante por *B. subtilis* TR47II está associada ao crescimento populacional, como indica a redução acentuada da tensão superficial do meio de cultivo, atingindo o valor mínimo em 6,5 horas de incubação, durante a fase *log* do crescimento microbiano. Essa observação é confirmada pelo aumento do espalhamento de óleo.

O espalhamento de óleo do sobrenadante da cultura apresentou um comportamento inverso ao da tensão superficial, como pode ser observado na Figura 1D. Houve um aumento linear de $0,067 \text{ cm h}^{-1}$ no diâmetro do halo de espalhamento de óleo até 30 horas de incubação, quando se atingiu um máximo de 2,02 cm. Após esse período, o espalhamento de óleo manteve-se constante, podendo-se concluir que a produção de biossurfactante, nas condições de cultivo

adotadas, foi interrompida a partir desse momento. Apesar disso, o rendimento de produção do extrato bruto de biossurfactante aumentou linearmente com o tempo até o final do período de incubação, com um acréscimo de $0,00653 \text{ g L}^{-1}$ a cada hora. O maior rendimento de extrato bruto de biossurfactante foi de $0,784 \text{ g L}^{-1}$, estimado ao final do período de incubação (120 horas).

Rendimentos de biossurfactantes na faixa de poucos miligramas por litro até aproximadamente $5,0 \text{ g L}^{-1}$ têm sido reportados para *B. subtilis*, o que varia com o isolado, a composição do meio de cultura e as condições de cultivo (Mukherjee *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2015; Gudiña *et al.*, 2015). Resultado semelhante ao obtido neste trabalho foi observado para *B. subtilis* SPB1, que mostrou um rendimento de $0,480 \text{ g L}^{-1}$ após cultivo por 48 horas em meio mineral contendo glicose (20 g L^{-1}) como fonte de carbono (Ghribi e Ellouze-Chaabouni, 2011). O fato do rendimento do extrato ter aumentado linearmente até o final do período de incubação, ao passo que os dados de espalhamento de óleo indicam a interrupção da produção de biossurfactantes a partir de 30 horas, indica que, após esse período, outras substâncias sem ação de superfície, e não biossurfactantes, passaram a se acumular no meio de cultivo. Essas substâncias, que não foram objeto desse estudo, contribuíram para aumentar a massa do extrato bruto liofilizado após o tempo de 30 horas, sem, contudo, contribuir com a atividade de superfície (p.ex., espalhamento de óleo).

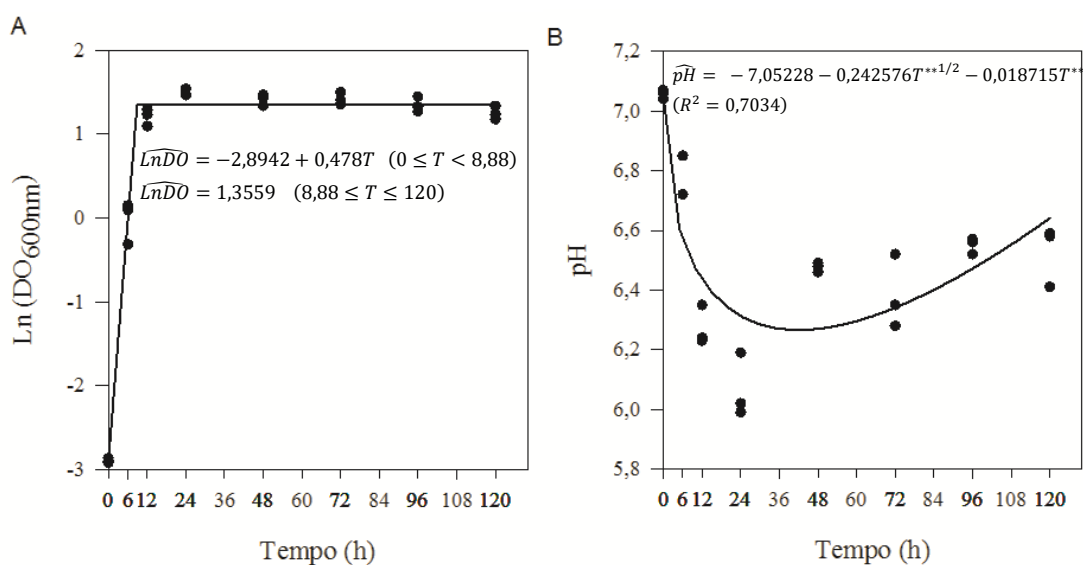


Figura 1. Crescimento e produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* TR47II a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 200 rpm por 120 horas em meio mineral contendo sacarose como fonte de carbono.

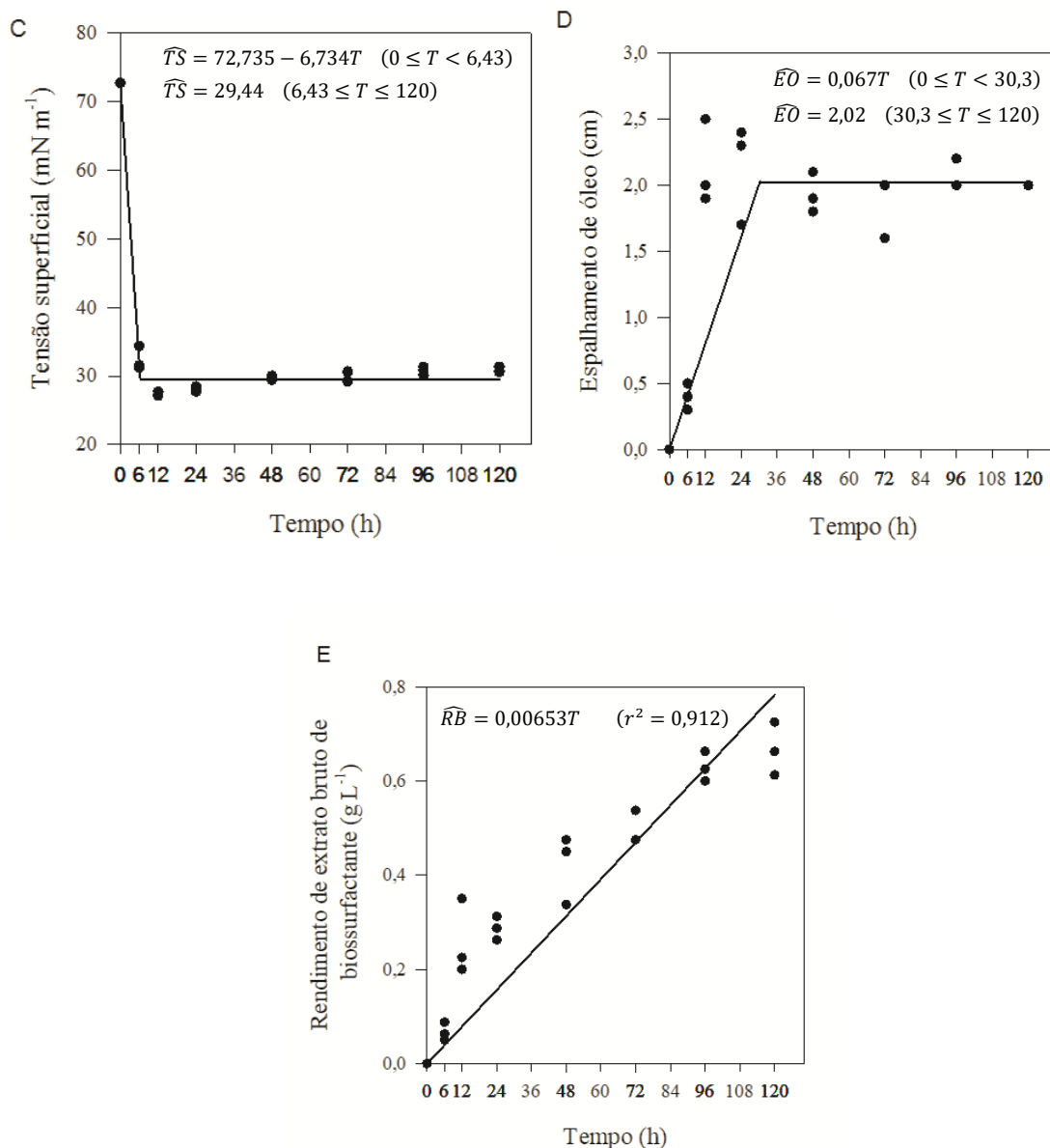


Figura 1 (continuação). Crescimento e produção de biosurfactante por *Bacillus subtilis* TR47II a 30 °C e 200 rpm por 120 horas em meio mineral contendo sacarose como fonte de carbono. As variáveis densidade óptica a 600nm ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) (A), pH (B), tensão superficial (C), espalhamento de óleo (D) e rendimento de extrato bruto de biosurfactante (E) foram estimadas em função do tempo de cultivo. As equações de regressão para as variáveis são apresentadas na figura. *, ** Significativo ao nível de 1 e 5 % de probabilidade respectivamente pelo teste “t”.

3.3.2. Purificação do extrato metanólico

Foram coletadas 89 frações de 7 mL cada durante a purificação do extrato metanólico por cromatografia em coluna. Após a fração 89, foi utilizado metanol como fase móvel e o volume (60 mL) foi coletado em um único frasco. O fator de

retenção (R_f) dos componentes revelados nas placas de CCD foi utilizado como parâmetro para agrupar as frações coletadas da coluna em três frações principais: F1, F2 e F3 (Figura 2).

As frações de 4 a 51 foram reunidas em F1, as frações de 52 a 89 foram reunidas em F2 e o volume eluído após a fração 89 foi coletado em F3. A fração F1 apresentou apenas uma mancha, com fator de retenção (R_f) de 0,86. F2 apresentou uma mancha com R_f semelhante ao da surfactina disponível comercialmente (Sigma-Aldrich), $R_f = 0,72$, e outra mancha com $R_f = 0,60$. Dentre os componentes da fração F3, foram observadas manchas que indicam R_f semelhantes aos dos padrões comerciais de iturina A ($R_f = 0,30$) e fengicina A ($R_f = 0,10$) (Sigma-Aldrich). O solvente das três frações foi evaporado em evaporador rotativo a 40 °C.

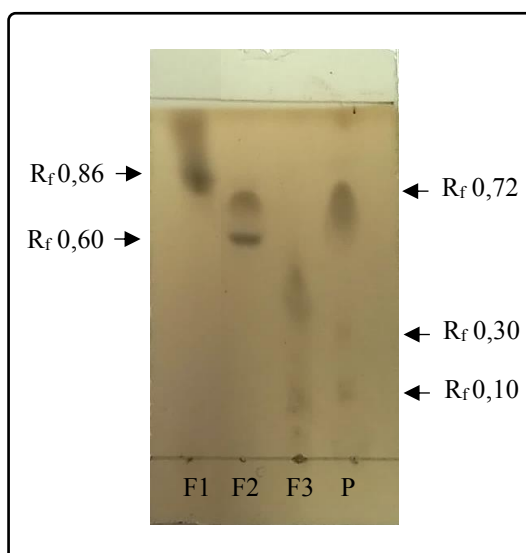


Figura 2. Cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato de *Bacillus subtilis* TR47II. As frações do extrato foram purificadas por cromatografia em coluna e reunidas em F1, F2 e F3 de acordo com o fator de retenção (R_f) após eluição em clorofórmio/metanol/água (65:25:4) e revelação com H_2SO_4 15 % em etanol ($v v^{-1}$). (P) Padrões comerciais de surfactina ($R_f = 0,72$), iturina A ($R_f = 0,30$) e fengicina A ($R_f = 0,10$).

3.3.3. Investigação da fração ativa e concentração mínima inibitória

A fração F3 foi a única fração que mostrou atividade antimicrobiana contra *D. alaskensis* no ensaio de susceptibilidade em microdiluições no meio Postgate B (Figura 3). *D. alaskensis* foi capaz de crescer em concentrações de até 0,039 mg mL⁻¹ de F3. O efeito inibitório dessa fração foi observado em concentrações a partir de 0,078 mg mL⁻¹. A CMI de F3 foi determinada em 0,156

mg mL⁻¹, correspondendo à menor concentração que inibiu completamente *D. alaskensis* em três repetições do experimento. Houve diminuição gradativa no valor de CMI do extrato bruto liofilizado (0,625 mg mL⁻¹), extrato metanólico (0,312 mg mL⁻¹) e F3 (0,156 mg mL⁻¹). Isso demonstra que a molécula ativa do extrato bruto de *B. subtilis* TR47II está de fato concentrada em F3 (Figura 3).

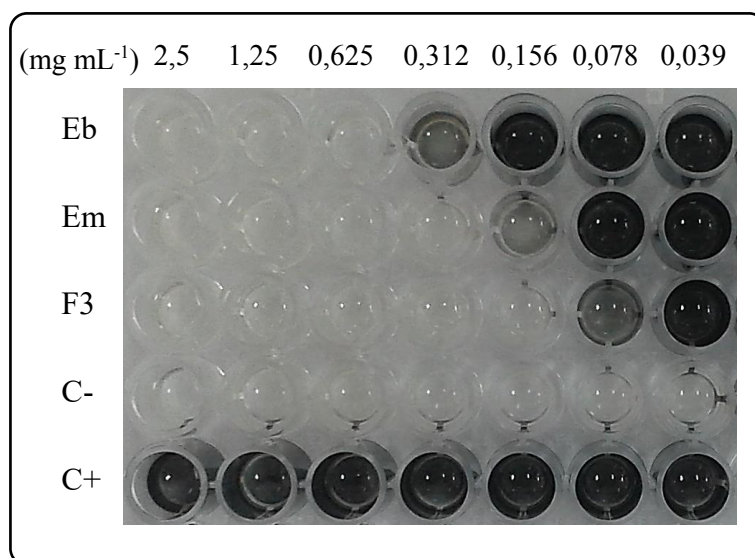


Figura 3. Concentração mínima inibitória (CMI) do extrato de biossurfactantes obtido de *Bacillus subtilis* TR47II contra a bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio alaskensis* (10⁵ UFC mL⁻¹). Microdiluições em meio Postgate B (100 µL) foram realizadas a partir das soluções-estoque (5 mg mL⁻¹) do extrato bruto (Eb), extrato metanólico (Em) e da fração ativa purificada em cromatografia em coluna (F3). C- (meio Postgate B não-inoculado), C+ (meio Postgate B inoculado).

3.3.4. Bioautografia

A atividade inibitória do extrato metanólico e da fração F3 foi confirmada por bioautografia em meio Postgate B. Em apenas 28 horas de incubação, halos claros e nítidos foram observados na placa de CCD inoculada com *D. alaskensis* em câmara de anaerobiose (Figura 4). O fator de retenção de F3 ($R_f = 0,27$) foi semelhante ao do extrato metanólico ($R_f = 0,25$) (Figura 4C) e do padrão comercial (Sigma-Aldrich) do lipopeptídeo iturina A ($R_f = 0,24$) (Figura 4B), indicando que provavelmente a molécula ativa de F3 é um lipopeptídeo semelhante à iturina. Nenhum halo de inibição foi verificado em R_f próximo ao do padrão de fengicina ($R_f = 0,08$).

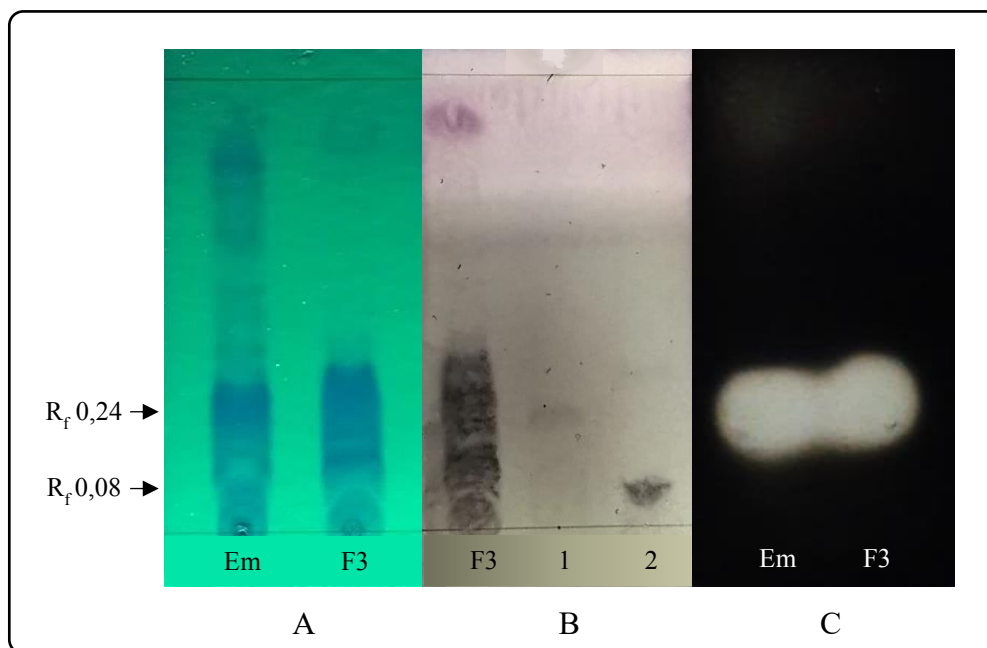


Figura 4. Bioautografia para avaliação da ação antimicrobiana do extrato metanólico e da fração ativa F3 purificada do extrato de *Bacillus subtilis* TR47II. (A) Cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato metanólico (Em) e de F3 visualizada sob luz ultravioleta. (B) CCD de F3 e dos padrões comerciais de iturina A (1) e fengicina A (2), revelados com ácido sulfúrico e vanilina ácida. (C) Bioautografia em meio Postgate B do extrato metanólico e da F3 contra *Desulfovibrio alaskensis* (10^5 UFC mL⁻¹) após 28 h de incubação a 30 °C em câmara de anaerobiose. Fator de retenção (R_f) é indicado pelas setas.

3.3.5. MALDI-TOF/TOF-MS das frações F2 e F3

A análise por MALDI-TOF/TOF-MS das frações purificadas a partir do extrato metanólico de *B. subtilis* TR47II permitiu identificar íons com m/z correspondentes a prováveis lipopeptídeos da família das surfactinas na fração F2, e das iturinas e fengicinas na fração ativa F3. O espectro por MALDI-TOF/TOF-MS da fração F1 não é apresentado aqui em razão da baixa intensidade dos picos e necessidade de análises adicionais.

Na Figura 5 é apresentado o espectro obtido por MALDI-TOF/TOF-MS da fração F2, a qual apresentou um grupo contendo várias moléculas com a faixa de m/z 1016 e 1102. Os três picos com sinal mais intenso foram m/z 1030,6; 1044,6; 1058,6 e 1072,6 (Figura 5 - Detalhe), os quais são atribuídos a moléculas de surfactina (Vater *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2015).

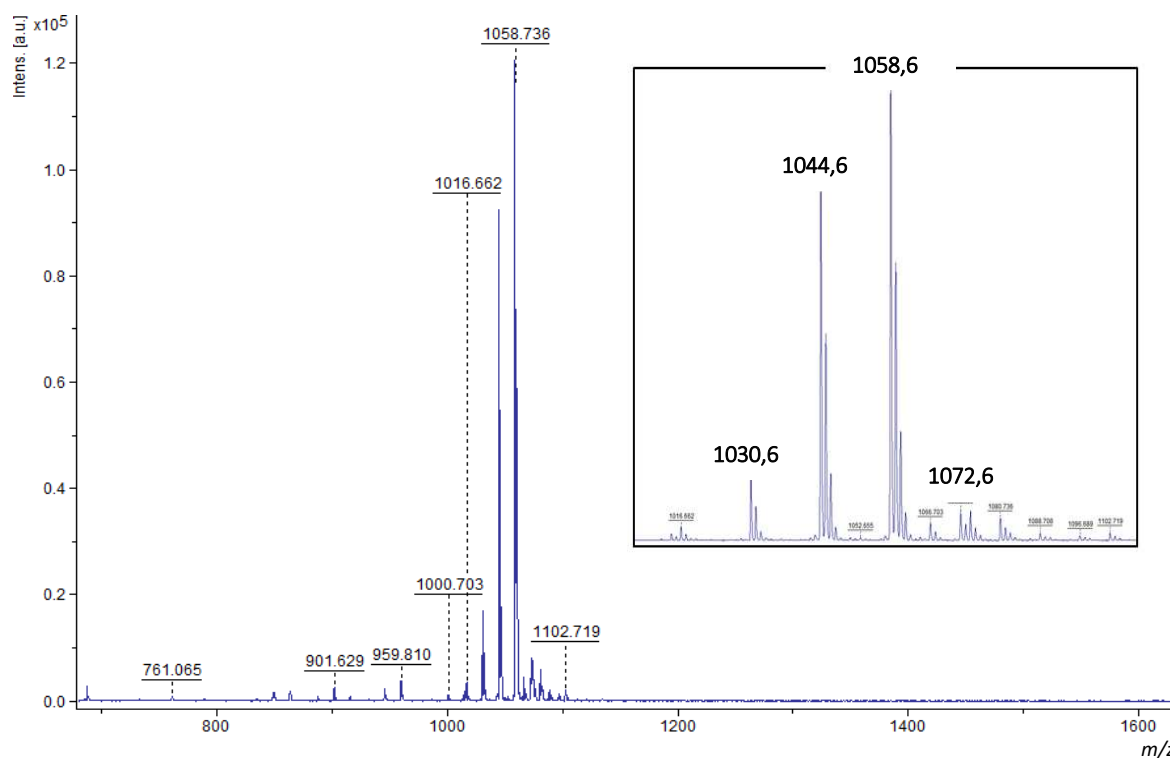


Figura 5. Espectro de massa adquirido por MALDI-TOF/TOF-MS da fração F2 do extrato metanólico de *Bacillus subtilis* TR47II. Em detalhe, a ampliação dos picos com sinais mais intensos.

A análise por MALDI-TOF/TOF-MS da fração contendo a molécula ativa (F3), mostrou dois grupos distintos com m/z variando de 1004 a 1087 e com m/z 1424 a 1545 (Figura 6A). Os picos com sinal mais intenso do primeiro grupo foram os de m/z 1043,5; 1057,5 e 1071,5 (detalhados na ampliação apresentada na Figura 6B). Esses picos diferem de 14Da, sugerindo uma série de moléculas homólogas apresentando diferentes comprimentos da cadeia de ácido graxo ($\text{CH}_2=14$ Da). Tais picos são atribuídos a moléculas de iturina (Cho *et al.*, 2003; Pathak e Keharia, 2014; Yang *et al.*, 2015). No segundo grupo, os picos com m/z 1463, 1477, 1485, 1491, 1503 e 1517 foram os de sinal mais intenso (Figura 6C), os quais são atribuídos a moléculas de fengicina (Vater *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2015).

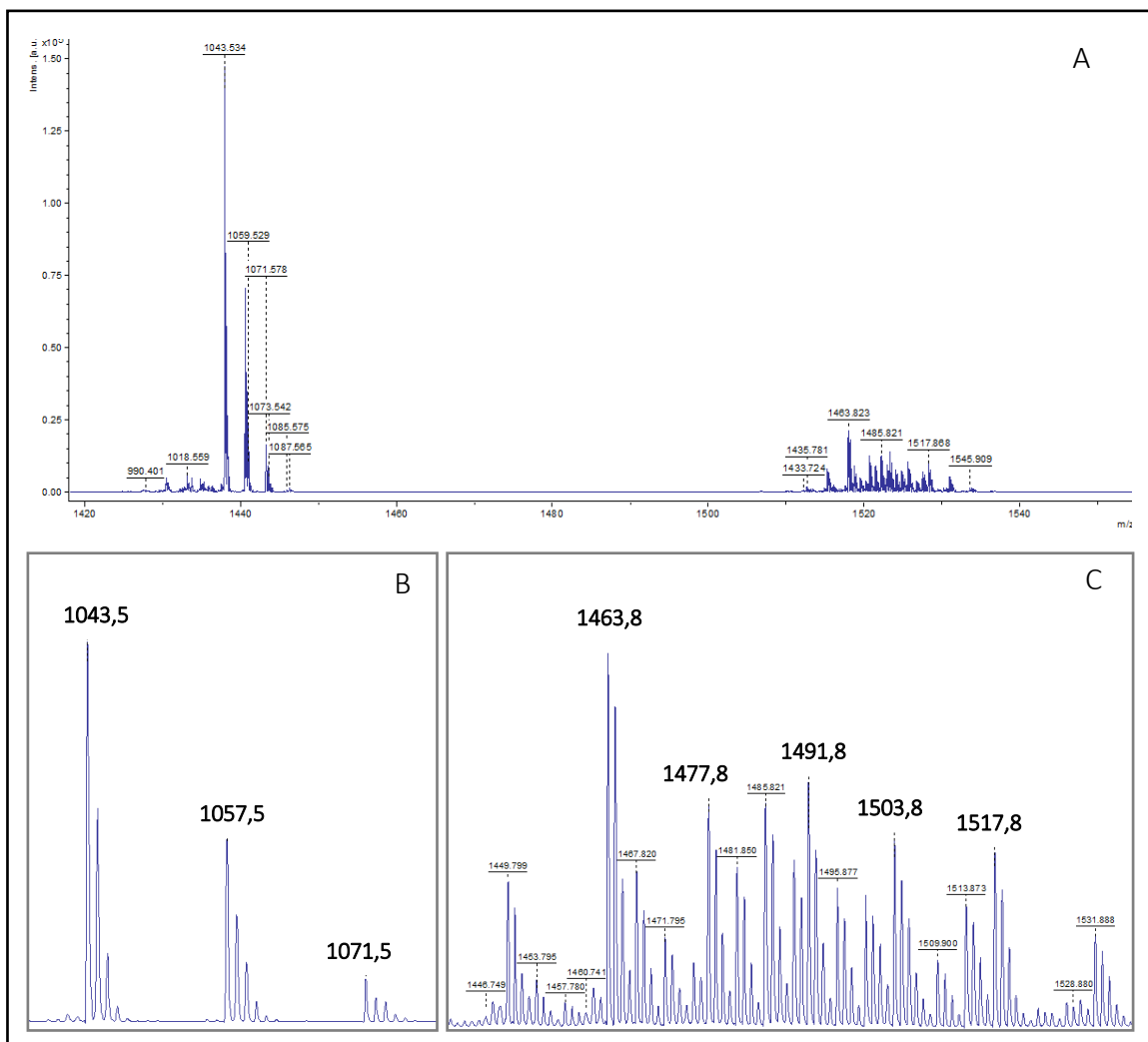


Figura 6. Espectro de massa adquirido por MALDI-TOF/TOF-MS da fração ativa (F3) do extrato metanólico de *Bacillus subtilis* TR47II (A). Em detalhe a ampliação dos picos com sinais mais intensos do grupo m/z 1004 a 1087 (B), e do grupo m/z 1424 a 1545 (C).

3.3.6. MALDI-TOF/TOF-MS/MS das frações F2 e F3

Os picos mais intensos das frações F2 e F3 e as massas semelhantes nos padrões de surfactina, iturina A e fengicina A foram analisados por MALDI-TOF/TOF-MS/MS. Os espectros de MS/MS das massas m/z 1030,6; 1044,6; 1058,6 e 1072,6 da fração F2 (Figuras 7A, 8A, 9A e 10A respectivamente) mostram grande semelhança com os espectros de MS/MS das massas correspondentes no padrão de surfactina (Figuras 7B, 8B, 9B e 10B respectivamente). A sobreposição dos respectivos espectros confirma a semelhança no perfil de fragmentação do padrão de surfactina e da fração F2 (Figuras 7C, 8C, 9C e 10C).

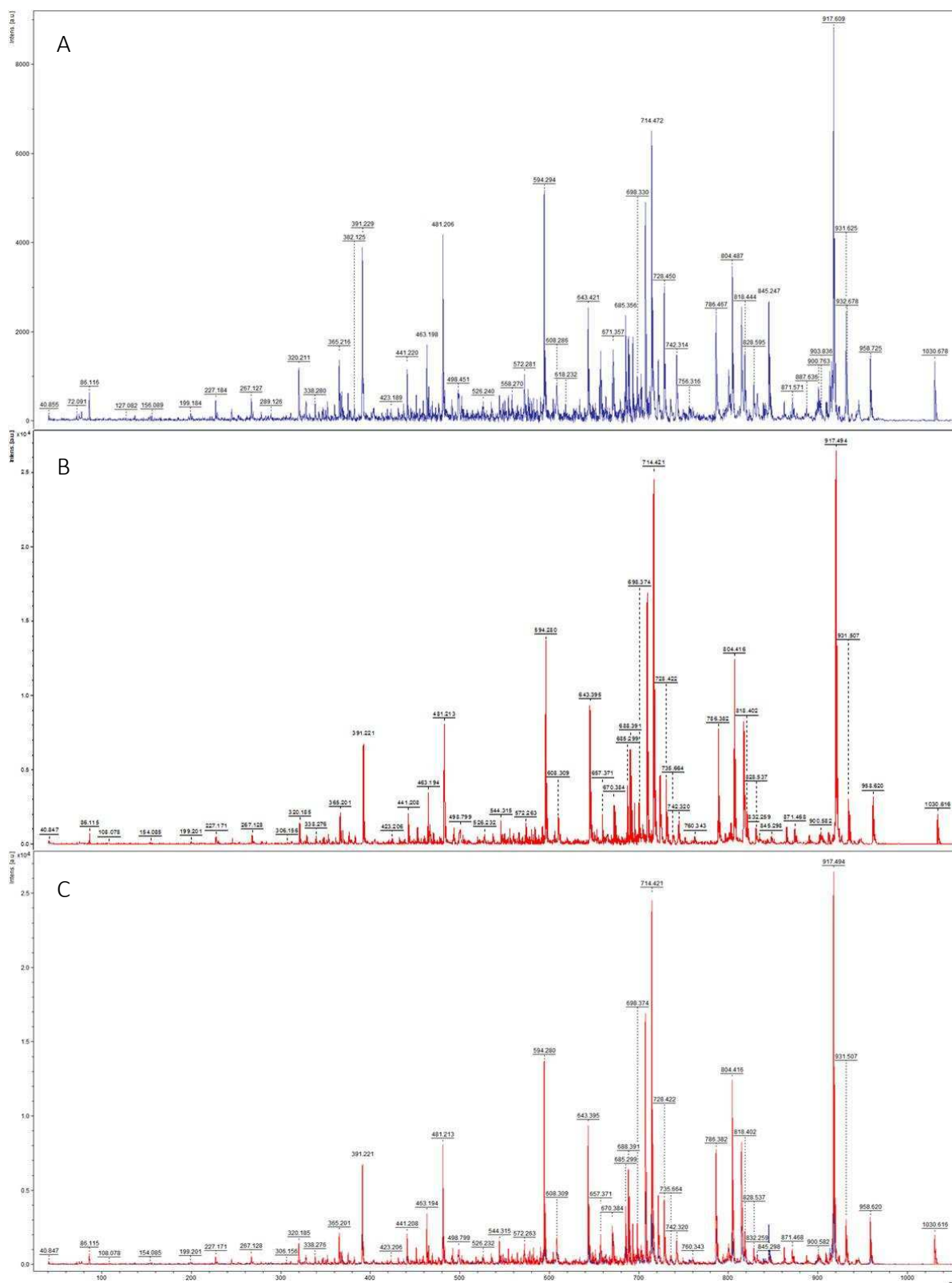


Figura 7. Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF/TOF-MS/MS da m/z 1030,6 do lipopeptídeo de *Bacillus subtilis* TR47II e do lipopeptídeo comercial surfactina. (A) Perfil de massa do lipopeptídeo m/z 1030,6 encontrado na fração F2; (B) Perfil de massa do lipopeptídeo m/z 1030,6 encontrado no padrão de surfactina; (C) Sobreposição dos perfis de massa do lipopeptídeo (A) e (B).

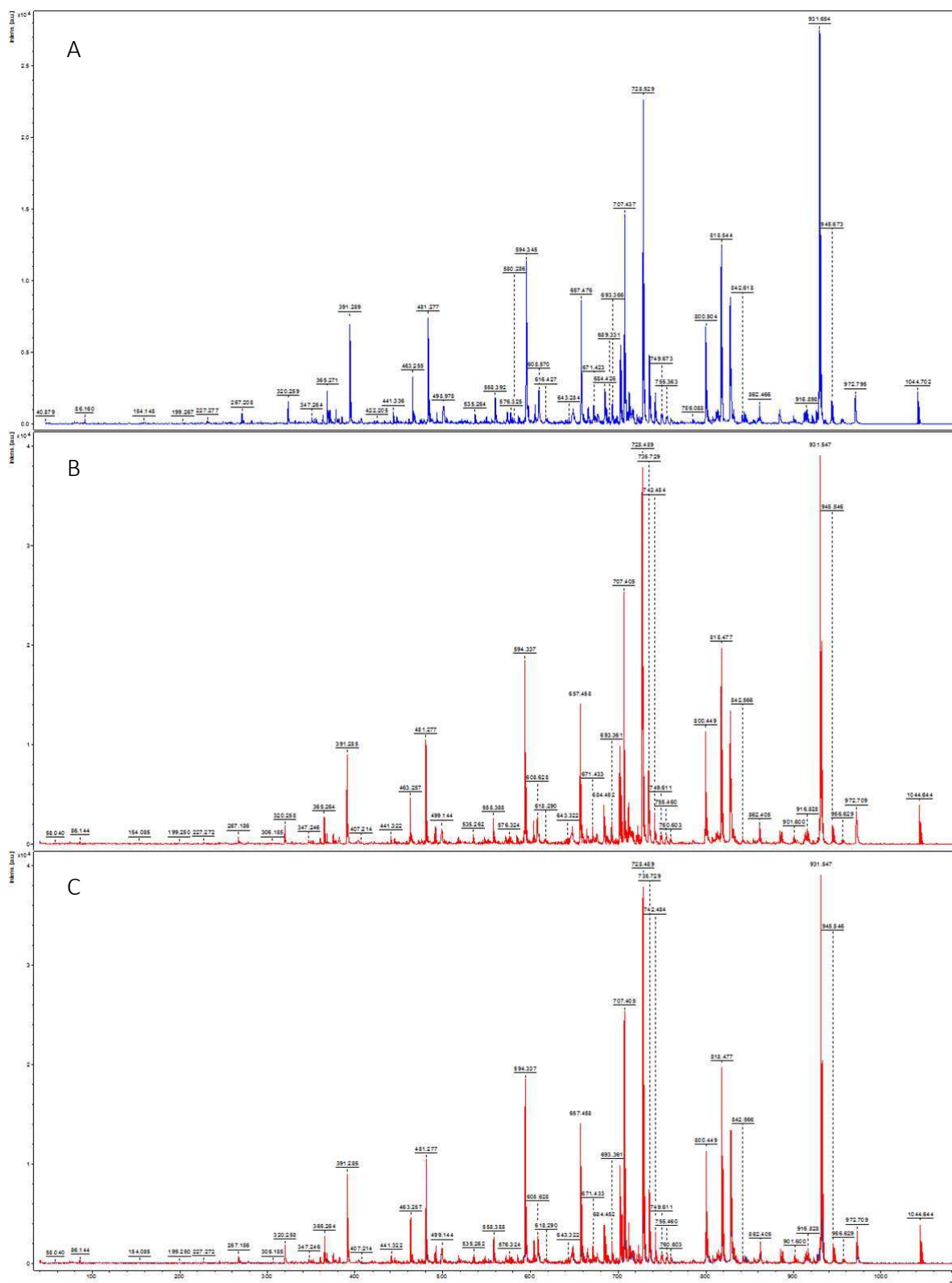


Figura 8. Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF/TOF-MS/MS da m/z 1044,6 do lipopeptídeo de *Bacillus subtilis* TR47II e do lipopeptídeo comercial surfactina. (A) Perfil de massa do lipopeptídeo m/z 1044,6 encontrado na fração F2; (B) Perfil de massa do lipopeptídeo m/z 1044,6 encontrado no padrão de surfactina; (C) Sobreposição dos perfis de massa do lipopeptídeo (A) e (B).

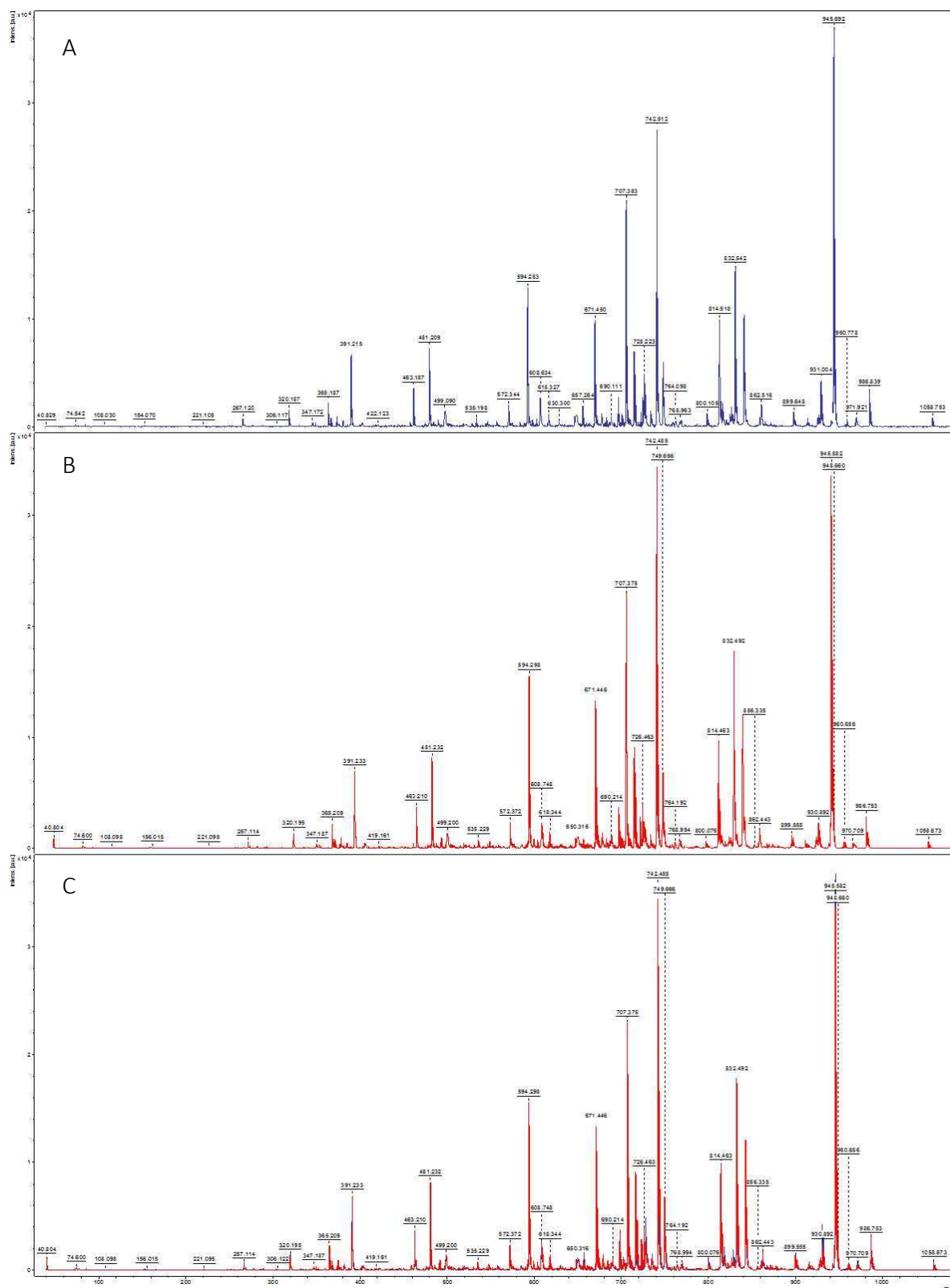


Figura 9. Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF/TOF-MS/MS da m/z 1058,6 do lipopeptídeo de *Bacillus subtilis* TR47II e do lipopeptídeo comercial surfactina. (A) Perfil de massa do lipopeptídeo m/z 1058,6 encontrado na fração F2; (B) Perfil de massa do lipopeptídeo m/z 1058,6 encontrado no padrão de surfactina; (C) Sobreposição dos perfis de massa do lipopeptídeo (A) e (B).

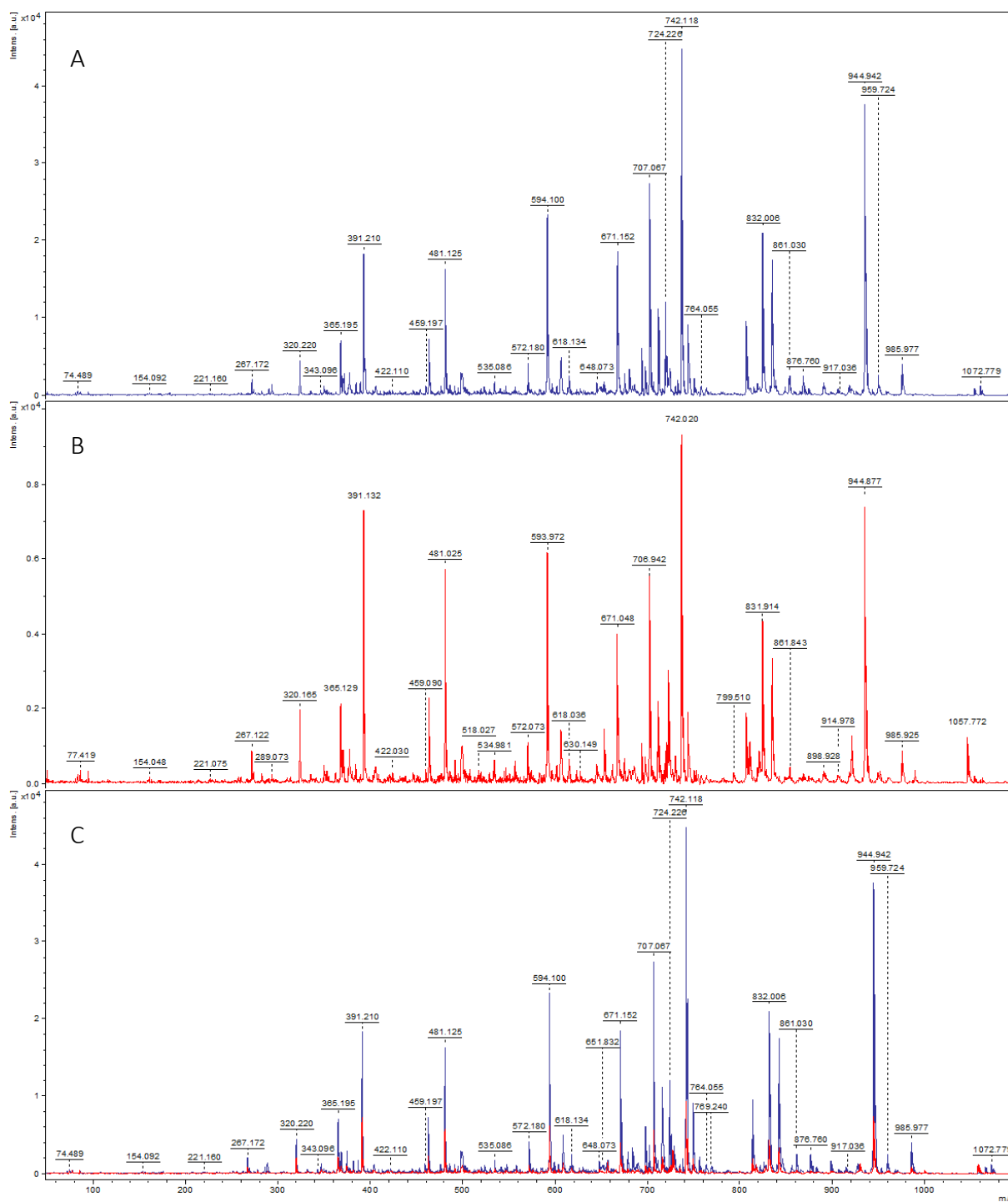


Figura 10. Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF/TOF-MS/MS da m/z 1072,6 do lipopeptídeo de *Bacillus subtilis* TR47II e do lipopeptídeo comercial surfactina. (A) Perfil de massa do lipopeptídeo m/z 1072,6 encontrado na fração F2; (B) Perfil de massa do lipopeptídeo m/z 1072,6 encontrado no padrão de surfactina; (C) Sobreposição dos perfis de massa do lipopeptídeo (A) e (B).

O íon em m/z 1030,6 encontrado na fração F2 foi identificado como uma surfactina contendo um β -hidroxi ácido graxo de 13 carbonos (C_{13}), com uma sequência peptídica Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu, cujo íon foi formado pela associação com sódio [$M+Na^+$] (Tabela 1). A Figura 11A mostra a análise por MALDI-TOF/TOF-MS/MS do íon em m/z 1030,6. Os íons-fragmentos da série “b” com m/z 590 (b3), m/z 689 (b4), m/z 804 (b5), m/z 917 (b6), e os íons-fragmentos da série “y” em m/z 154 (y1), m/z 267 (y2), m/z 382 (y3), m/z 481 (y4), m/z 594 (5), m/z 707 (y6) foram todos detectados no espectro (Figura 11A). A análise dos espectros MS/MS das moléculas em m/z 1044,6, 1058,6 e 1072,6 mostrou a mesma sequência peptídica encontrada em m/z 1030,6, bem como uma diferença de 14 Da (CH_2) na cadeia de ácido graxo (Figura 11B-D e Tabela 1). Isso evidenciou uma série de homólogos de surfactina C_{13} (m/z 1030,6), C_{14} (m/z 1044,6), C_{15} (m/z 1058,6) e C_{16} (m/z 1072,6) β -hidroxi ácido graxo. Os íons encontrados referentes aos resíduos formadores da sequência peptídica das séries “b” e “y” para os íons m/z 1030,6, 1044,6, 1058,6 e 1072,6 são mostrados na Tabela 2.

Tabela 1. Valores de massa referentes às sequências encontradas para as surfactinas na fração F2 com β -hidroxi ácido graxo contendo 13, 14, 15 e 16 carbonos.

Sequência	Massa			
	C_{13}	C_{14}	C_{15}	C_{16}
Ácido graxo	212	226	240	254
E	129	129	129	129
L	113	113	113	113
L	113	113	113	113
V	99	99	99	99
D	115	115	115	115
L	113	113	113	113
L	113	113	113	113
Na ⁺	23	23	23	23
Total	1030	1044	1058	1072

Ácido glutâmico (E); Leucina (L); Valina (V); Ácido aspártico (D)

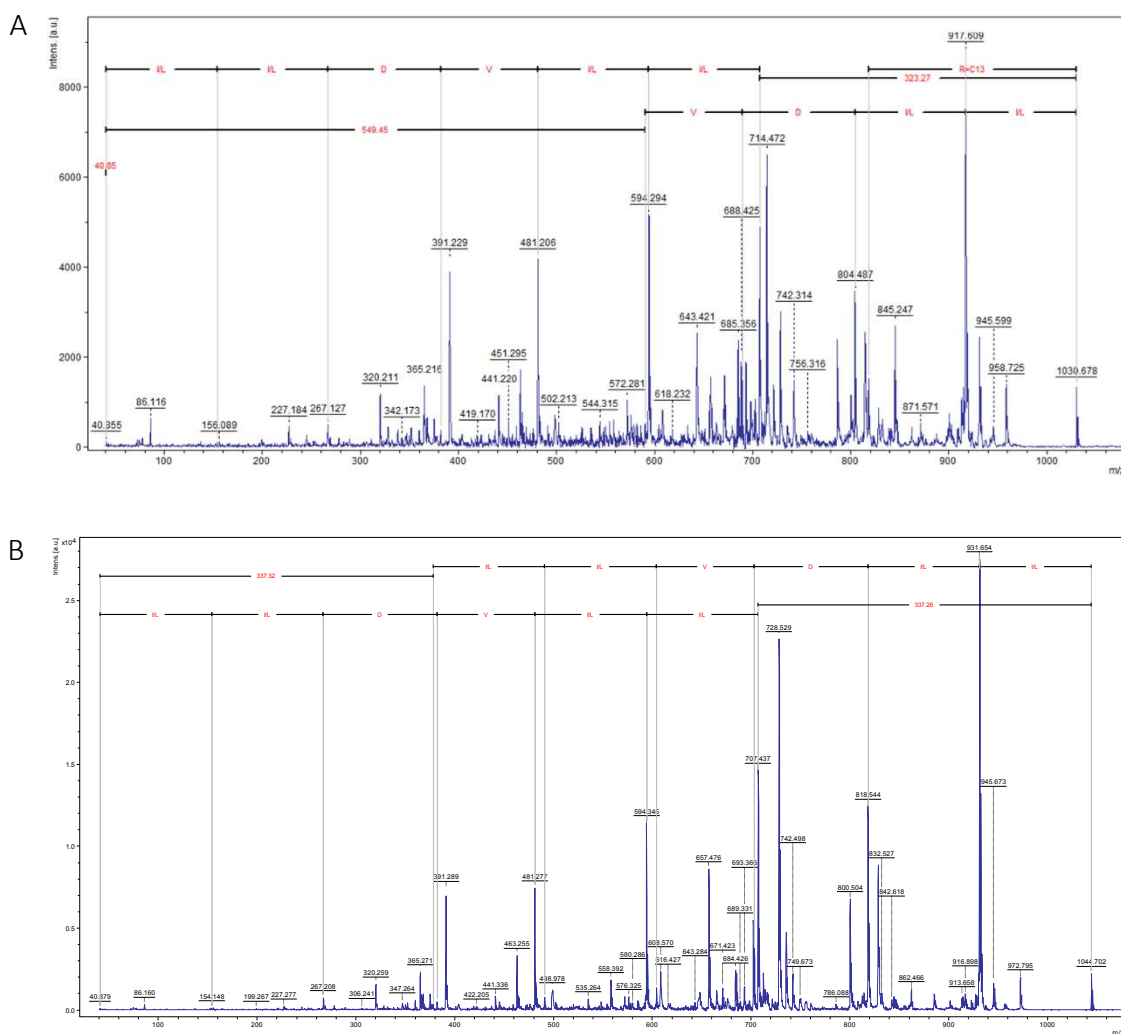


Figura 11. Espectros MALDI-TOF/TOF-MS/MS dos íons m/z 1030,6; 1044,6; 1058,6 e 1072,6 mostrando as sequências encontradas para as surfactinas contendo cadeia de ácidos graxos C_{13} a C_{16} presentes na fração F2 do extrato metanólico de *Bacillus subtilis* TR47II. (A) MS/MS da surfactina $[M+Na]^+$ em m/z 1030,6 contendo a sequência peptídica Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu e uma cadeia C_{13} de β -hidroxi ácido graxo. (B) MS/MS da surfactina $[M+Na]^+$ em m/z 1044,6 contendo a sequência peptídica Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu e uma cadeia C_{14} de β -hidroxi ácido graxo.

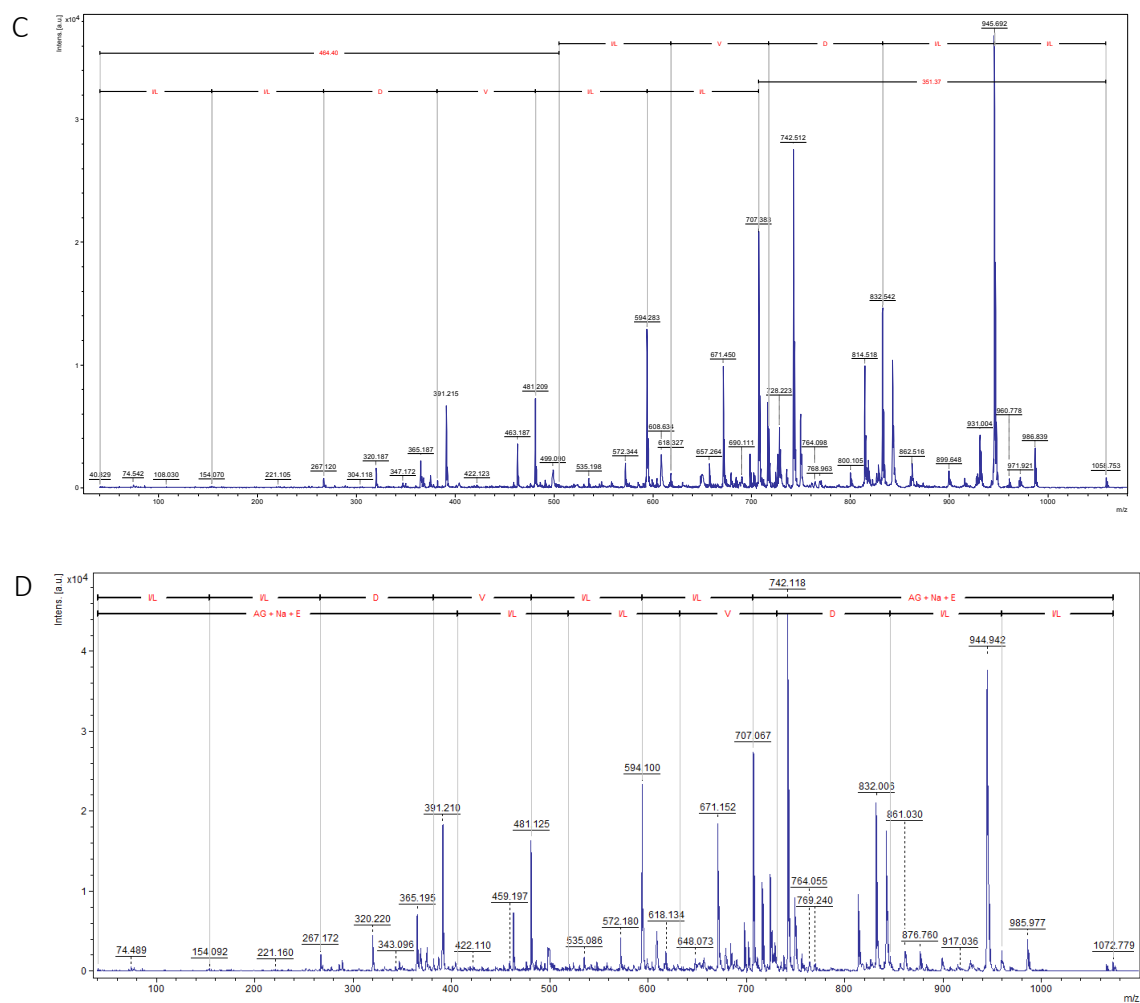


Figura 11 (continuação). Espectros MALDI-TOF/TOF-MS/MS dos íons m/z 1030,6; 1044,6; 1058,6 e 1072,6 mostrando as sequências encontradas para as surfactinas contendo cadeia de ácidos graxos C_{13} a C_{16} presentes na fração F2 do extrato metanólico de *Bacillus subtilis* TR47II. (C) MS/MS da surfactina $[M+Na]^+$ em m/z 1058,6 contendo a sequência peptídica Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu e uma cadeia C_{15} de β -hidroxi ácido graxo. (D) MS/MS da surfactina $[M+Na]^+$ em m/z 1072,6 contendo a sequência peptídica Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu e uma cadeia C_{16} de β -hidroxi ácido graxo.

Tabela 2. Tabela de fragmentação com os valores de m/z dos picos encontrados nas séries “b” e “y” para a identificação da sequência peptídica das surfactinas da fração F2, com β -hidroxi ácido graxo com 13, 14, 15 e 16 carbonos.

Série “b”	m/z	Sequência	m/z	Série “y”
		Ácido graxo	1030	
b1	-	E	-	y7
b2	-	L	707	y6
b3	590	L	594	y5
b4	689	V	481	y4
b5	804	D	382	y3
b6	917	L	267	y2
b7	1030	L	154	y1
		Ácido graxo	1044	
b1	378	E	-	y7
b2	491	L	707	y6
b3	604	L	594	y5
b4	703	V	481	y4
b5	818	D	382	y3
b6	931	L	267	y2
b7	1044	L	154	y1
		Ácido graxo	1058	
b1	-	E	-	y7
b2	505	L	707	y6
b3	618	L	594	y5
b4	717	V	481	y4
b5	832	D	382	y3
b6	945	L	267	y2
b7	1058	L	154	y1
		Ácido graxo	1072	
b1	406	E	-	y7
b2	519	L	707	y6
b3	632	L	594	y5
b4	731	V	481	y4
b5	846	D	382	y3
b6	959	L	267	y2
b7	1072	L	154	y1

Valores de m/z não encontrados no espectro de massa (-). Ácido glutâmico (E); Leucina (L); Valina (V); Ácido aspártico (D).

Em F3, a fração ativa, a análise por MALDI-TOF/TOF-MS/MS do íon m/z 1043,5 mostrou divergência em relação à intensidade e posição dos picos com o espectro MS/MS do íon m/z 1043,5 do padrão de iturina A (Figura 12). Durante o sequenciamento, foi observado que o padrão apresentou picos com sinais mais intensos, o que favoreceu a obtenção da sequência dos resíduos, confirmando a presença de um β -amino ácido graxo $[M+H]^+$ com 14 carbonos e a sequência peptídica Asn-Tyr-Asn-Gln-Pro-Asn-Ser (Figura 13C). No entanto, para a fração F3, a mesma sequência para o íon m/z 1043,5 só foi obtida após a habilitação de picos de baixa intensidade (Figura 13A). A divergência de picos e intensidade de sinal pode ser exemplificada com o resíduo de asparagina (N), o qual foi encontrado em ambos os perfis. No perfil da fração F3 esse resíduo apareceu entre os íons da série “b” com m/z 639 e 525, ambos com intensidade aproximada de 500 unidades arbitrárias (Figura 13B). Já no perfil do padrão de iturina, o mesmo resíduo apareceu entre os íons da série “b” com m/z 638 e 524, com intensidades próximas de 15.000 e 2.500 respectivamente (Figura 13D).

As características de perfis comentadas para o íon com m/z 1043,5 foram observadas também para o íon com m/z 1057,5, o qual mostrou divergência em relação à intensidade e posição dos picos com o espectro MS/MS do íon m/z 1057,5 do padrão de iturina (Figura 14). Isso pode ser observado para o resíduo de asparagina (N), encontrado em ambos os perfis. No perfil da fração F3, esse resíduo apareceu entre os íons da série “b” m/z 652 e 538, ambos com intensidade aproximada de 200 unidades arbitrárias (Figura 15B). No perfil do padrão de iturina, o mesmo resíduo apareceu entre os íons da série “b” m/z 652 com intensidade próxima de 8.000 e m/z 538 com intensidade próxima de 1.000 (Figura 15D).

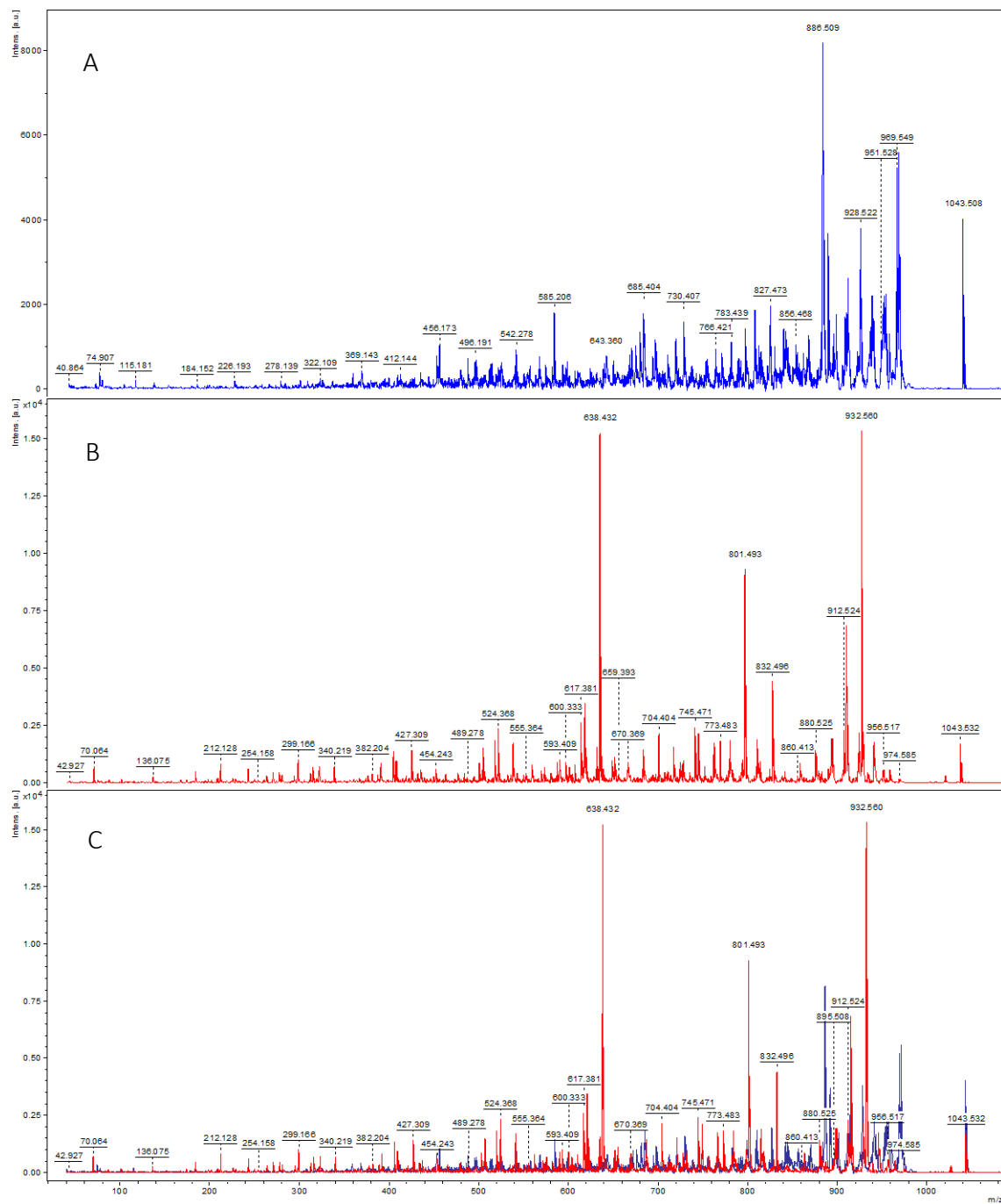


Figura 12. Espectro de massa adquirido por MALDI-TOF/TOF-MS/MS do íon m/z 1043,5 do extrato de *Bacillus subtilis* TR47II e do lipopeptídeo comercial iturina A. (A) Perfil de massas do íon m/z 1043,5 encontrado na fração ativa F3; (B) Perfil de massas do íon m/z 1043,5 encontrado no padrão de iturina; (C) Sobreposição dos espectros (A) e (B).

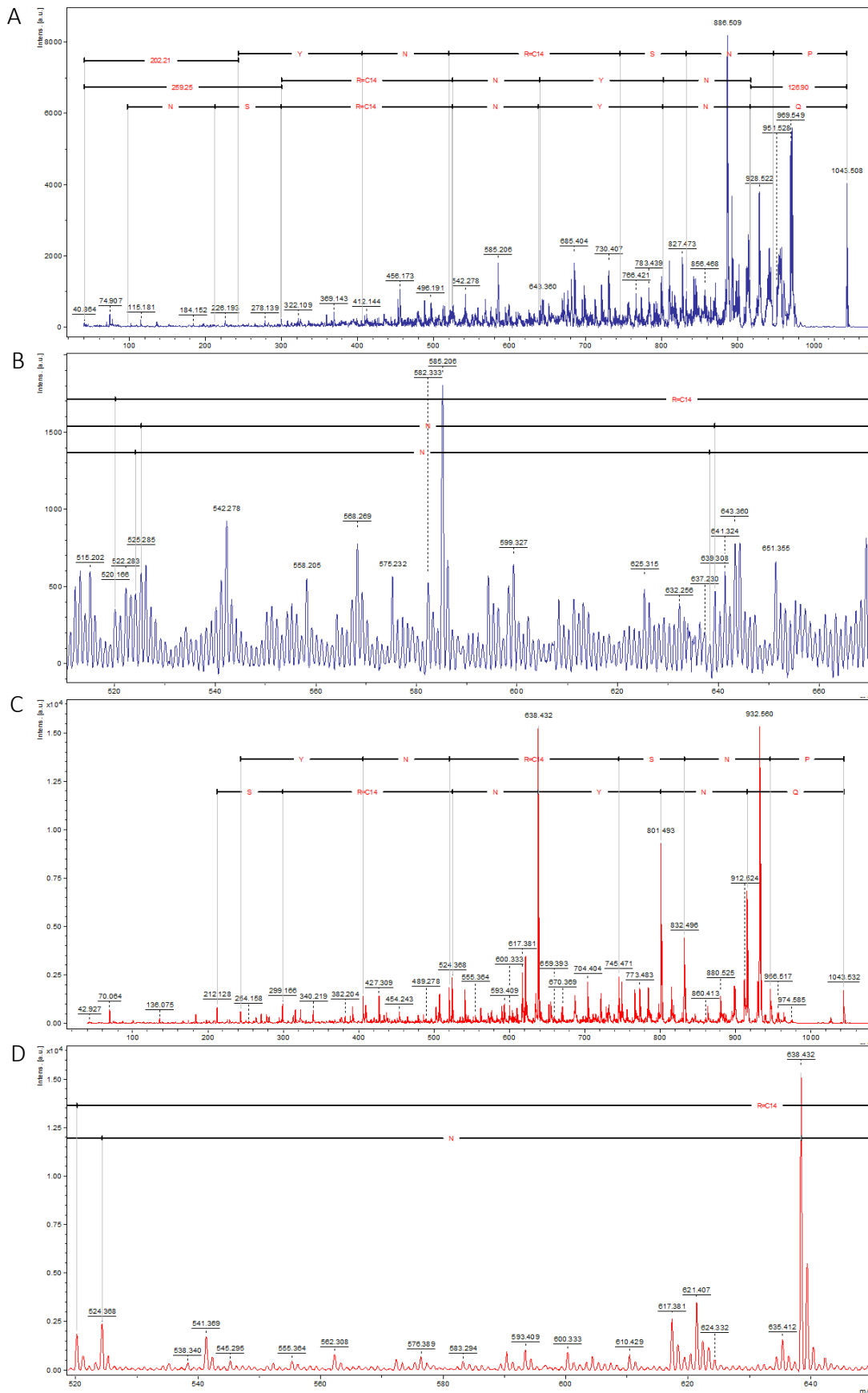


Figura 13. Espectro de massa adquirido por MALDI-TOF/TOF-MS/MS do íon m/z 1043,5 sequenciado manualmente. (A) Perfil de massas do íon m/z 1043,5 encontrado na fração ativa F3 (B) Detalhe do resíduo asparagina (N), encontrado nos fragmentos da série “b” do íon m/z 1043,5 da fração F3 (C) Perfil de massas do íon m/z 1043,5 encontrado no padrão de iturina A; (D) Detalhe do resíduo asparagina (N), encontrado nos fragmentos da série “b” do íon m/z 1043,5 do padrão de iturina.

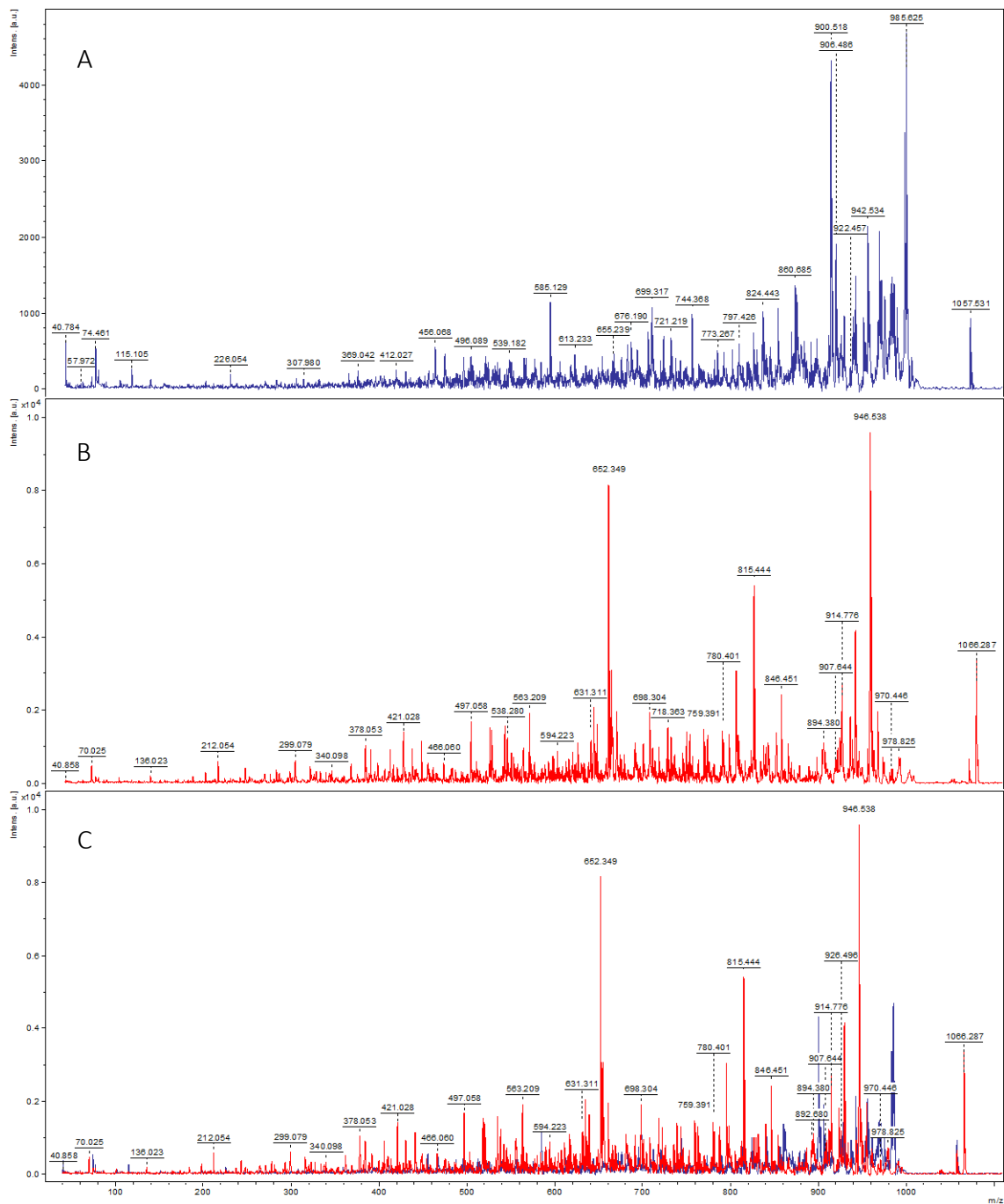


Figura 14. Espectro de massa adquirido por MALDI TOF/TOF-MS/MS do íon m/z 1057,5 do extrato de *Bacillus subtilis* TR47II e do lipopeptídeo comercial iturina A. (A) Perfil de massas do íon m/z 1057,5 encontrado na fração ativa F3; (B) Perfil de massas do íon m/z 1057,5 encontrado no padrão de iturina; (C) Sobreposição dos espectros (A) e (B).

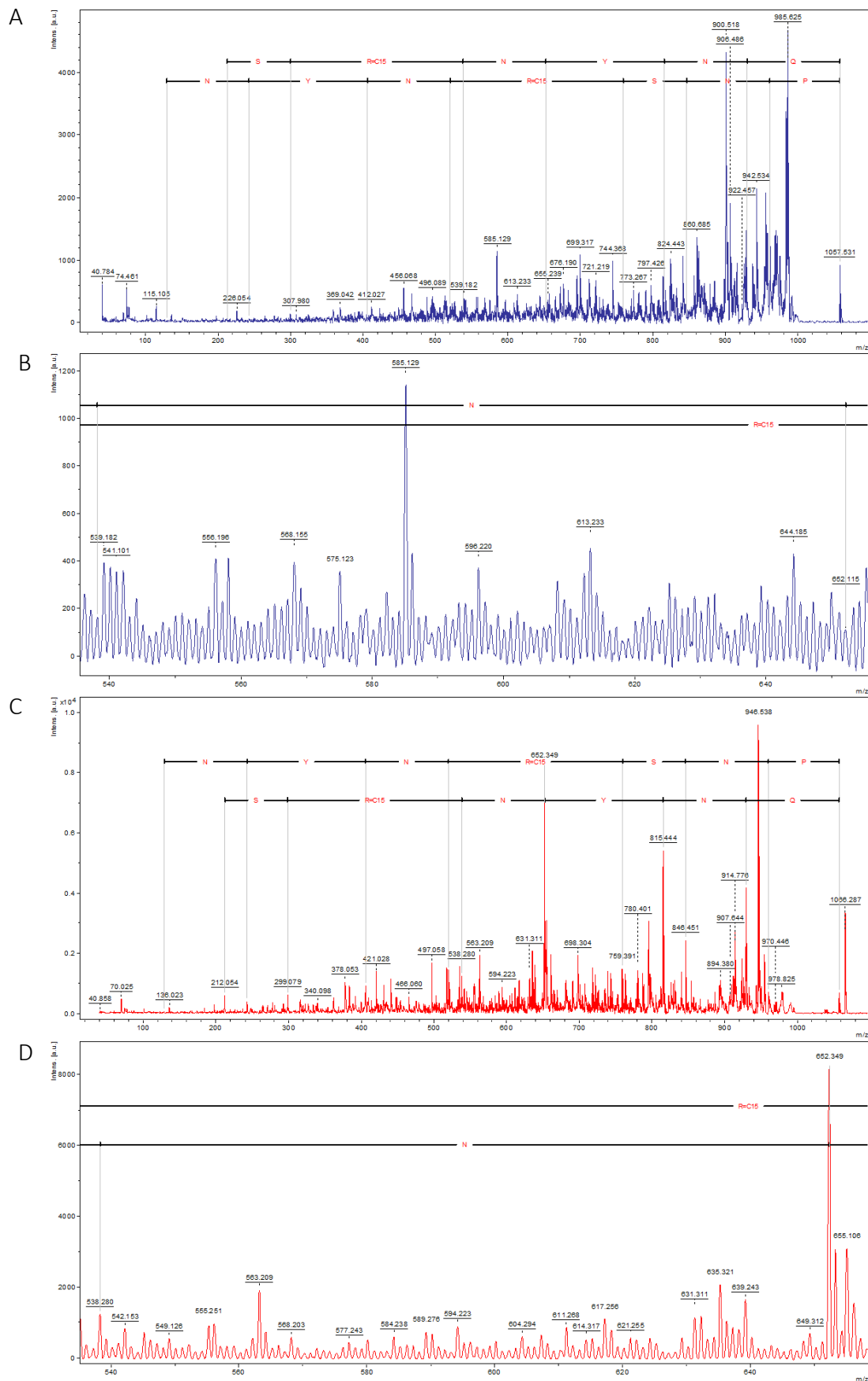


Figura 15. Espectro de massa adquirido por MALDI TOF/TOF-MSMS do íon m/z 1057,5, sequenciado manualmente. (A) Perfil de massas do íon m/z 1057,5 encontrado na fração ativa F3; (B) Detalhe do resíduo asparagina (N) encontrado nos fragmentos da série “b” do íon m/z 1057,5 da fração F3; (C) Perfil de massas do íon m/z 1057,5 do padrão de iturina; (D) Detalhe do resíduo asparagina (N) encontrado nos fragmentos da série “b” do íon m/z 1057,5 do padrão de iturina.

No segundo grupo de massas encontrado na fração ativa F3, o íon m/z 1463,8 apresentou maior intensidade de sinal em relação aos demais íons na análise por MALDI-TOF/TOF-MS, sendo por isso utilizado para análise no modo MS/MS. Na Figura 16, é possível observar divergência tanto em intensidade do sinal quanto em distribuição dos picos de MS/MS do referido íon (Figura 16A), em comparação com o espectro MS/MS do padrão de fengicina A (Figura 16B).

Durante as análises de identificação, não foi possível obter uma sequência satisfatória do íon m/z 1463,8 tanto para a F3 quanto para o padrão de fengicina. No entanto, alguns íons importantes foram observados nos espectros de F3, quando o mesmo foi sobreposto ao espectro do padrão de fengicina: m/z 226 e 389 (Figura 16C), os quais representam uma tirosina na série “b”; m/z 966 e 1080 (Figura 16D), os quais podem representar uma ornitina na série “y”. Esses íons evidenciam a existência de fengicina nessa faixa de massa da fração F3, pois podem ser observados tanto no padrão, quanto em trabalho anterior usado como referência (Yang *et al.*, 2015). Esses autores identificaram a presença de fengicina em uma fração de lipopeptídeos sintetizados por *B. subtilis* THY-7, usando MALDI-TOF/TOF. Nos espectros de MS/MS do íon m/z 1463 adquiridos pelos autores, apareceram os fragmentos m/z 115, 226 e 389 na série “b”, sendo que os dois últimos representam uma tirosina. Na série “y”, apareceram os fragmentos m/z 966 e 1080, os quais compunham um grupo de íons com maior intensidade de sinal do espectro e representam o resíduo de ornitina. No espectro de MS/MS da fração F3, os referidos íons encontrados também apresentaram sinais com maior abundância relativa, quando comparados com o restante dos íons do espectro (Figura 16A). Tais íons também foram observados no espectro do padrão de fengicina (Figura 16B).

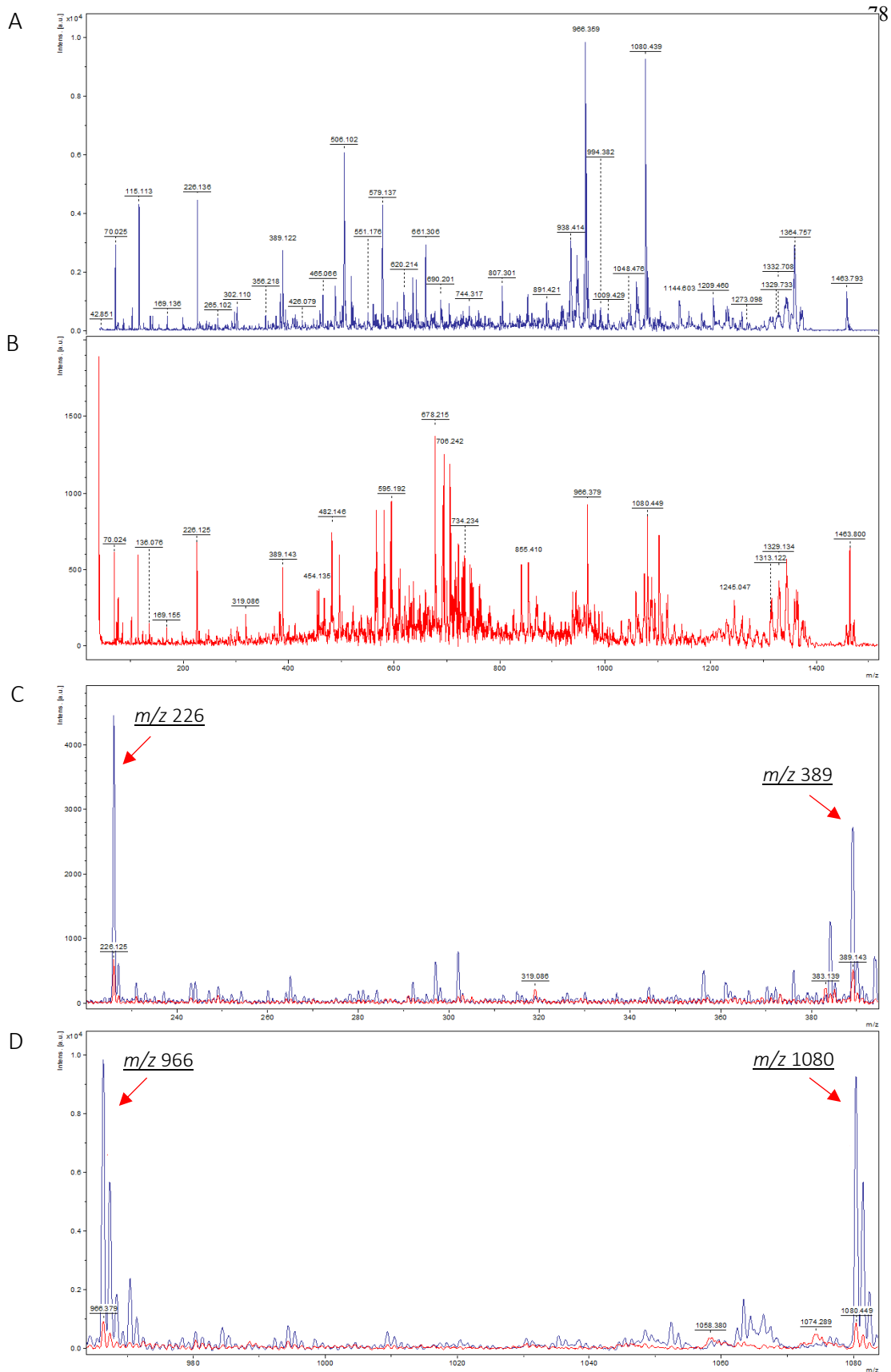


Figura 16. Espectro de massa adquirido por MALDI TOF/TOF-MS/MS do íon m/z 1463,8 do extrato de *Bacillus subtilis* TR47II e do lipopeptídeo comercial fengicina A. (A) Perfil de massas do íon m/z 1463,8 encontrado na fração ativa F3; (B) Perfil de massas do íon m/z 1463,8 do padrão de fengicina; (C) Detalhe dos íons m/z 226 e 389 em sobreposição dos espectros (A) e (B), os quais representam uma tirosina na série “b”; (D) Detalhe dos íons m/z 966 e 1080, em sobreposição dos espectros (A) e (B), os quais podem representar uma ornitina na série “y”.

3.4. Discussão

Lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* spp. constituem uma das principais classes de biossurfactantes, conhecidos por suas excelentes propriedades tensoativas e antimicrobianas. Essas características os tornam moléculas de grande interesse da comunidade científica e do setor industrial (Liu *et al.*, 2016). Na indústria do petróleo, as principais aplicações dessas moléculas incluem a biorremediação de áreas contaminadas e estratégias de recuperação do petróleo melhorada por microrganismos (Chen *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016). Além disso, como resultado da reconhecida atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos, essas moléculas têm sido foco de estudos para o controle do crescimento de BRS (Korenblum *et al.*, 2012), as quais são causadoras de um dos principais problemas na indústria do petróleo: o *souring* biogênico (Johnson *et al.*, 2017).

Neste estudo, uma fração ativa do extrato bruto de *B. subtilis* TR47II com ação antimicrobiana contra a BRS *D. alaskensis* NCIMB 13491 foi purificada e caracterizada quimicamente. Há poucos relatos sobre o isolamento e caracterização química de lipopeptídeos com ação antimicrobiana contra BRS. Recentemente, El-Sheshtawy *et al.* (2015) isolaram um lipopeptídeo produzido por *B. licheniformis* capaz de inibir um consórcio de BRS. No entanto, a composição química do lipopeptídeo não foi elucidada. Korenblum *et al.* (2012) utilizaram o extrato de biossurfactante de *Bacillus* sp. H2O-1 contra a BRS *D. alaskensis* NCIMB 13491, o mesmo isolado do presente trabalho. O principal componente antimicrobiano foi identificado como homólogos de surfactina contendo a sequência peptídica Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu e variando na cadeia de β -hidroxi ácido graxo C₁₃, C₁₄, C₁₅ e C₁₆.

No nosso estudo, a fração ativa (F3) do extrato de *B. subtilis* TR47II contra *D. alaskensis* NCIMB 13491, mostrou um fator de retenção semelhante ao do padrão comercial de iturina, quando analisada por bioautografia em meio Postgate B. A análise por MALDI-TOF/TOF-MS da fração ativa mostrou dois grupos distintos em m/z correspondentes a prováveis lipopeptídeos da família das iturinas (m/z 1004 a 1087) e fengicinas (m/z 1424 a 1545) (Vater *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 2015). Alguns íons de maior intensidade nesses espectros foram analisados por MALDI-TOF/TOF-MS/MS. A análise dos íons m/z 1043 e 1057 no

primeiro grupo, mostrou evidências da presença de iturina, uma vez que apresentou picos referentes aos resíduos de sua sequência, embora em baixa intensidade. Os íons m/z 1043, 1057 e 1071 em F3, diferem em 14 Da, sugerindo ainda uma série de moléculas homólogas. Cho *et al.* (2003) encontraram os mesmos picos em m/z compondo os lipopeptídeos antifúngicos produzidos por *B. subtilis* KS03. O espectro por MALDI-TOF/TOF-MS/MS do íon m/z 1043 obtido pelos autores foi o mesmo obtido para a iturina A comercial.

Há evidências ainda da presença de fengicina compondo a fração F3, tais como os fragmentos m/z 226 e 389, m/z 966 e 1080, os quais fazem parte da sequência de tal lipopeptídeo. Tais fragmentos foram igualmente encontrados no espectro MALDI-TOF-MS/MS do íon m/z 1463,8 do lipopeptídeo fengicina C₁₆, [M+H]⁺ 6-Ala reportado por Yang *et al.*, (2015). Em nosso estudo, a dificuldade de conclusão da análise da fração ativa F3 decorre da complexidade da fração e da presença de prováveis impurezas na amostra. A purificação adicional dos dois grupos de m/z encontrados na fração ativa F3 irá contribuir para uma melhor resolução da análise por MALDI-TOF/TOF-MS/MS e, conseqüentemente, para confirmar a estrutura química do lipopeptídeo (possivelmente iturina) ativo contra *D. alaskensis*. Além disso, a purificação e caracterização estrutural da molécula ativa deverá contribuir para se elucidar seu modo de ação contra *D. alaskensis*.

A análise por MALDI-TOF/TOF-MS/MS confirmou que *B. subtilis* TR47II produz ainda homólogos de surfactina, os quais foram identificados a partir da fração não-ativa F2. Os íons em m/z 1030, 1044, 1058 e 1072 foram identificados como adutos de sódio da surfactina [M+Na⁺] contendo um β -hidroxi ácido graxo de 13, 14, 15 e 16 carbonos, respectivamente, com a sequência peptídica Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu, a mesma sequência encontrada na fração ativa de *Bacillus* sp. H2O-1 (Korenblum *et al.*, 2012). Isso indica que provavelmente a surfactina com a cadeia de ácido graxo C₁₆ seja a molécula ativa no extrato produzido por *Bacillus* sp. H2O-1, uma vez que ela foi identificada no extrato metanólico de *B. subtilis* TR47II com menor intensidade.

A coprodução de lipopeptídeos tem sido relatada em outros estudos. Sun *et al.*, (2006) relataram a coprodução de fengicinas e surfactinas por *B. amyloliquefaciens* ES-2. *B. subtilis* THY-7 produz uma mistura de lipopeptídeos constituída por iturina, fengicina e surfactina (Yang *et al.*, 2015). *Bacillus* sp.

LBBMA 111A produz uma mistura de prováveis homólogos de iturinas, surfactinas e fengicinas (Lima *et al.*, 2008). A coprodução de lipopeptídeos por *B. subtilis* TR47II confere uma vantagem adicional para o controle de BRS na indústria do petróleo, o qual constitui um grupo muito amplo que inclui vários gêneros e espécies de bactérias gram positivas e negativas, bem como membros do domínio Archaea. Aqui, um lipopeptídeo, provavelmente iturina, foi inequivocamente eficiente contra o isolado *D. alaskensis* NCIMB 13491. Os demais lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis* TR47II têm grande potencial de serem eficientes contra outros isolados de BRS, o que deve ser foco de investigações futuras.

Este é o primeiro relato da purificação e caracterização química de biosurfactantes produzidos por isolado da Ilha da Trindade, bem como de sua ação antimicrobiana contra BRS. Trindade é uma ilha oceânica brasileira de origem vulcânica, distante 1167 km do continente, localizada no Atlântico Sul. O isolamento geográfico, a biodiversidade única e solos com características diferentes daquelas encontradas em áreas continentais, são fatores que têm atraído a atenção para pesquisas em ilhas oceânicas, incluindo o isolamento e estudo de microrganismos e de comunidades microbianas (Da Silva *et al.*, 2015; Pylro *et al.*, 2015; Morais *et al.*, 2016; Rodrigues, 2016). Este estudo incentiva a continuidade das pesquisas naquele local e abre a oportunidade de descoberta de novas moléculas ativas que possam ser aplicadas no setor industrial, particularmente na indústria de petróleo.

3.5. Conclusões

A fração ativa contra *D. alaskensis* NCIMB 13491 purificada do extrato de biosurfactantes de *B. subtilis* TR47II apresentou fator de retenção semelhante ao do padrão de iturina A em ensaio de bioautografia. A análise por MALDI-TOF/TOF-MS dessa fração revelou picos em m/z correspondentes a prováveis lipopeptídeos das famílias de iturinas e fengicinas. Evidências da presença desses lipopeptídeos na fração ativa foram obtidas por MALDI-TOF/TOF-MS/MS. A análise MS/MS da fração não ativa contra *D. alaskensis* revelou ainda a produção dos homólogos de surfactina C₁₃, C₁₄, C₁₅ e C₁₆ por *B. subtilis* TR47II, com a sequência de aminoácidos Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu na cadeia peptídica.

3.6. Referências

- Chen, W.C., Juang, R.S., Wei, Y.H., 2015. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 103, 158–169.
- Cho, S-J., Lee, S.K., Cha, B.J., Kim, Y.H., Shin, K-S. 2003. Detection and characterization of *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturina A from *Bacillus subtilis* strain KS03. *FEMS Microbiology Letters*, 223, 47-51.
- Da Silva, F.S.P., Pylro, V.S., Fernandes, P.L., Barcelos, G.S., Kalks, K.H.M., Schaefer, C.E.G.R., Tótolá, M.R., 2015. Unexplored Brazilian oceanic island host high salt tolerant biosurfactant-producing bacterial strains. *Extremophiles*, 19, 561–572.
- Elmawgoud, H.A., Elshiekh, T.M., Khalil, S.A., Alsabagh, A.M., Tawfik, M. 2015. Modeling of hydrogen sulfide removal from Petroleum production facilities using H₂S scavenger. *Egyptian Journal of Petroleum*, 24, 131–137.
- El-Sheshtawy, H.S., Aiad, I., Osman, M.E., Abo-Elnasr, A.A., Kobisy, A.S. 2015. Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. *Egyptian Journal of Petroleum*. 24, 155–162.
- Faria, A.F., Martinez, D.S.T., Barbosa, G.N.O., Vaz, B.G., Silva, I.S., Garcia, J.S., Tótolá, M.R., Eberlin, M.N., Grossman, M., Alves, O.L., Durrant, L.R., 2011. Production and structural characterization of surfactin (C₁₄/Leu₇) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. *Process Biochemistry*, 46, 1951-1957.
- Feio, M.J., Zinkevich, V., Beech, I.B., Llobet-Brossa, E., Eaton, P., Schmitt, J., Guezennec, J., 2004. *Desulfovibrio alaskensis* sp. Nov., a sulphate reducing bacterium from a soured oil reservoir. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*, 54, 1747–1752.
- Ghribi, D., Ellouze-Chaabouni, S. 2011. Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration. *Biotechnology Research International*, 2011, 1-6.
- Gieg, L.M., Jack, T.R., Foght, J.M., 2011. Biological souring and mitigation in oil reservoirs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 263–282.
- Gudiña, E.J., Fernandes, E.C., Rodrigues, A.I., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R. 2015. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-7.
- Hubert, C., Voordouw, G. 2007. Oil field souring control by nitrate-reducing *Sulfurospirillum* spp. that outcompete sulfate-reducing bacteria for organic electron donors. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 2644–2652.
- Johnson, R.J., Folwella, B.D., Wirekoha, A., Frenzela, M., Skovhus, T.L. 2017. Reservoir Souring-Latest developments for application and mitigation. *Journal of Biotechnology*.
- Korenblum, E., Araujo, L.V., Guimarães, C.C.R., Souza, L.M., Sasaki, G., Abreu, F., Nitschke, M., Lins, U., Freire, D.M.G., Barreto-Bergter, E., Seldin, L., 2012. Purification

and characterization of a surfactin-like molecule produced by *Bacillus* sp. H2O-1 and its antagonistic effect against sulfate reducing bacteria. *BMC Microbiology*, 12, 1-13.

Lima, T.M.S. Determinação estrutural, toxicidade, biodegradabilidade e eficácia de biossurfactantes na remoção de fenantreno e cádmio de solo. 2008. 174 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Lima, T.M.S., Procópio, L.C., Brandão, F.D., Carvalho, A.M.X., Tótola, M.R., Borges, A.C., 2011. Biodegradability of bacterial surfactants. *Biodegradation*, 22, 585-592.

Liu, B., Liu, J., Jua, M., Li, X., Yu, O. 2016. Purification and characterization of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* Y-1 and its application in remediation of petroleum contaminated soil. *Marine Pollution Bulletin*, 107, 46–51.

Meena, K.R., Kanwar, S.S. 2015. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *BioMed Research International*, 2015, 1-10.

Morais, D., Pylro, V., Clark, I.M., Hirsch, P.R., Tótola, M.R. 2016. Responses of microbial community from tropical pristine coastal soil to crude oil contamination. *PeerJ*, 4, 1-21.

Mougin, P., Lamoureux-Var, V., Bariteau, A., Huc, A.Y. 2007. Thermodynamic of thermochemical sulphate reduction. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 58, 413-427.

Mukherjee, S., Das, P. Sem, R. 2006. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology*, 24, 509-515.

Muyzer, G., Stams, A.J.M. 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews*, 6, 441-454.

Pathak, K.V., Keharia, H., 2014. Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist, *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) tree using mass spectrometry. *3 Biotech*, 4, 283–295.

Postgate, J.R., 1984. The sulphate-reducing bacteria, second ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Pylro V.S., Roesch L.F., Ortega J.M., Do Amaral A.M., Tótola M.R., Hirsch P.R., Rosado A.S., Góes-Neto A., Da Silva A.L., Rosa C.A., Morais D.K., Andreote F.D., Duarte G.F., De Melo I.S., Seldin L., Lambais M.R., Hungria M., Peixoto R.S., Kruger R.H., Tsai S.M., Azevedo V. 2014. Brazilian microbiome project: revealing the unexplored microbial diversity-challenges and prospects. *Microbial Ecology*, 67, 237–241.

Reiffenstein, R.J, Hulbert, W.C., Roth, S.H., 1992. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual Review Pharmacology and Toxicology*, 32, 109-134.

Rodrigues, E.M. Biodiversidade microbiana da Ilha da Trindade, prospecção genética e aplicações biotecnológicas utilizano micro-organismos autóctones. 2016. 150f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Sahnoun, R., Mnif, I., Fetoui, H., Gdoura, R., Chaabouni, K., Makni-Ayadi, F., Kallel, C., Ellouze-Chaabouni, S., Ghribi, D. 2014. Evaluation of *Bacillus subtilis* spb1 lipopeptide

biosurfactant toxicity towards mice. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 20, 333-340.

Santos, D.K.F., Rufino, R.D., Luna, M.J., Santos, V.A., Sarubbo, L.A. 2016. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1-31.

Shaligram, N.S., Rekha S. Singhal, R.S., 2010. Surfactin - a review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 119-134.

Sriram, M.I., Kalishwaralal, K., Deepak, V., Gracerosepat, R., Srisakthi, K., Gurunathan, S., 2011. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. *Colloids and Surface B Biointerfaces*, 85, 174-181.

Sun, G.L., Lu, Z., Bie, X., Lu, F., Yang, S., 2006. Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 1259-1266.

Tang, K., Baskaran, V., Nemati, M. 2009. Bacteria of the sulphur cycle: an overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochemical Engineering Journal*, 44, 73-94.

Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N., Cameotra, S.S., 2002. Matrix-assisted 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*, 68, 6210-6219.

Xu, D., Gu, T., 2015. The war against problematic biofilms in the oil and gas industry. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 7, 1-2.

Yang, H., Li, X., Li, X., Yu, H., Shen, Z., 2015. Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and surfactin by RP-HPLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 2529-2542.

Conclusões Gerais

Conclusões Gerais

Nosso estudo descreve, pela primeira vez, a ação antimicrobiana contra BRS de extratos brutos contendo biossurfactantes obtidos de isolados da Ilha da Trindade. *B. subtilis* TR12, *B. subtilis* TR22, *B. subtilis* TR35II e *B. subtilis* TR47II inibiram o crescimento da BRS *Desulfovibrio alaskensis* NCIMB 13491 em concentração de 8 vezes a CMC. Dentre eles, *B. subtilis* TR47II apresentou extrato bruto com melhor efeito antimicrobiano, e por isso foi selecionado para investigação da molécula ativa.

A fração ativa purificada do extrato metanólico de *B. subtilis* TR47II mostrou fator de retenção semelhante ao padrão comercial de iturina A em avaliação por bioautografia e análises por MALDI-TOF/TOF-MS mostraram picos em m/z correspondentes a prováveis lipopeptídeos dessa família. Análises por MALDI-TOF/TOF-MS/MS dos picos mais intensos evidenciaram fragmentos correspondentes a esses lipopeptídeos, mas em baixa intensiva. A fração ativa mostrou ainda picos em m/z correspondentes a prováveis lipopeptídeos da família das fengicinas, mas nenhuma ação antimicrobiana foi verificada por essas moléculas por bioautografia. Homólogos de surfactinas com a sequência peptídica Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu e variação na cadeia lateral em C₁₃, C₁₄, C₁₅ e C₁₆ β -hidroxi ácido graxo, respectivamente, foram identificados na fração não-ativa do extrato de *B. subtilis* TR47II.

Esse é o primeiro relato de um provável lipopeptídeo iturina com ação antimicrobiana contra BRS. Os resultados obtidos aqui abrem a oportunidade de caracterização de uma nova molécula ativa contra BRS. Além disso, incentivam pesquisas futuras para avaliação do extrato de *B. subtilis* TR47II contra outros isolados de BRS, potencializando sua aplicação na indústria do petróleo para o controle do *souring* biogênico.