

**LEONARDO LOURENÇO LOPES**

**ISOLAMENTO E TRIAGEM DE MICRORGANISMOS TERMÓFILOS E  
HALOTOLERANTES PRODUTORES DE BIOSURFACTANTES**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2014**

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

T

L864i  
2014  
Lopes, Leonardo Lourenço, 1985-  
Isolamento e triagem de microrganismos termófilos e  
halotolerantes produtores de biossurfactantes / Leonardo  
Lourenço Lopes. - Viçosa, MG, 2014.  
xi, 54f : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador : Marcos Rogério Tótola.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 47-54.

1. Biossurfactantes. 2. Resíduos sólidos urbanos.  
3. Termófilos. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Microbiologia. Programa de  
Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

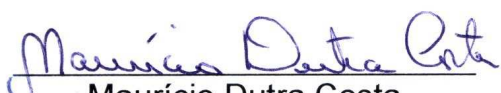
CDD 22. ed. 668.1

LEONARDO LOURENÇO LOPES

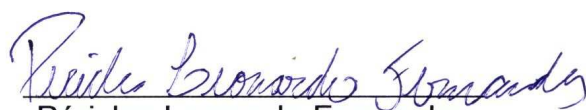
**ISOLAMENTO E TRIAGEM DE MICRORGANISMOS TERMÓFILOS E  
HALOTOLERANTES PRODUTORES DE BIOSURFACTANTES**


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

APROVADA: 25 de julho de 2014.

  
Maurício Dutra Costa  
(Coorientador)

  
Wendel Batista da Silveira  
(Coorientador)

  
Péricles Leonardo Fernandes

  
Marcos Rogério Tótola  
(Orientador)

A Deus, aos meus pais e as minhas irmãs.

A todos os amigos que me apoiaram.

O meu MUITO OBRIGADO!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas infinitas graças concedidas.

Aos meus pais, Carlos Norberto Lopes e Nelita Soares de Moura Lopes, e as minhas irmãs, Laurinda dos Reis Lopes e Karla Juliana Lopes, pelo amor incondicional, pela força, apoio e incentivo.

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

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

Ao professor Marcos Rogério Tótola, meu orientador, e a Cássia Fernandes, pelo auxílio no meu crescimento.

Aos professores Célia Moraes, Maurício Costa, Wendel Silveira, Antônio Galvão, Denise Bazzoli pelos aconselhamentos.

Às professoras Cristina Vanetti e Flávia Lopes, pela oportunidade de me permitir assistir suas aulas como aluno ouvinte antes de eu me ingressar no mestrado.

A todos os demais professores do Departamento de Microbiologia e aos professores Juraci Oliveira (DBG) e Alessandra Ambrozim (DEQ), pelos ensinamentos, amizade e confiança.

A todos os colegas do laboratório, pela ajuda e pela amizade, em especial ao amigo Gustavo Sampaio, pela companhia nas várias “horas extras” e finais de semana. Aos amigos Péricles Fernandes, Karlos Kalks, Bruna Leão, pelos ensinamentos, pelas orientações e todas as correções necessárias.

Ao André Marota e família, pelo carinho, companheirismo e acolhimento.

Ao Douglas Gontijo, além da grande amizade, pela força e apoio na minha chegada a Viçosa.

As amigas Isabel Batista, Elaine Batista e D. Glória Batista, que mesmo longe, sempre estiveram presentes.

Aos amigos verdadeiros que fiz em Viçosa e na UFV, em especial Taidés Santos, Josi Santos, Patrícia Nobre, Fábio Rodrigues, Thiago Mariani, Lívia Gonzada, Kamila Yuyama, Merielle Angélica, Roméria Silva.

As meninas da secretaria, Nilcéa Pinheiro, Letícia Freitas e Sandra de Assis, pela assistência em todos os processos.

“Se não houver frutos  
Valeu a beleza das flores  
Se não houver flores  
Valeu a sombra das folhas  
Se não houver folhas  
Valeu a intenção da semente.”

(Henfil)

## **BIOGRAFIA**

Leonardo Lourenço Lopes, filho de Nelita Soares de Moura Lopes e Carlos Norberto Lopes, é natural de Barão de Cocais, MG. Nascido em 18 de novembro de 1985, graduou-se em Ciências Biológicas – Licenciatura, em dezembro de 2007 na Fundação Comunitária de Ensino Superior de Itabira (FUNCESI), MG. De 2008 a 2011 lecionou Ciências e Biologia para os ensinos Fundamental II e Médio em escolas estadual, municipal e particular. Neste mesmo período, trabalhou como Coordenador Pedagógico de Ciências e Biologia na Rede Pitágoras, capacitando professores nestas duas áreas de ensino, em diversos estados brasileiros. É autor de uma coleção de livros didáticos de Biologia para o Ensino Médio. Ingressou no mestrado em Microbiologia Agrícola na UFV em agosto de 2012.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Microrganismos extremófilos .....	3
2.1.1. Microrganismos termófilos e hipertermófilos .....	4
2.1.2. Microrganismos halófilos e halotolerantes .....	6
2.2 Solutos compatíveis .....	7
2.3. Compostagem.....	8
2.4. Biossurfactantes .....	9
2.4.1 Grupos de microrganismos produtores de biossurfactantes ...	10
2.4.2. Tipos de biossurfactantes .....	10
2.4.3. Aplicações dos biossurfactantes .....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Local e coleta das amostras .....	13
3.2. Isolamento de termófilos .....	13
3.3. Isolamento de halotolerantes .....	14
3.4. Isolamento de poliextremófilos (termófilos e halotolerantes) .....	15
3.5. Avaliação da produção de biossurfactantes.....	15
3.5.1. Meios utilizados.....	15
3.5.2. Tensão superficial .....	16
3.5.3. Velocidade específica de crescimento .....	17
3.6. Análise do perfil de ácidos graxos .....	17
3.7. Identificação dos isolados .....	17
3.8. Preservação dos isolados .....	18
3.9. Análise estatística .....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
4.1. Isolamento das bactérias termófilas .....	20
4.2. Isolamento das bactérias halotolerantes .....	21
4.3. Isolamento das bactérias poliextremófilas .....	22
4.4. Produção de biossurfactantes.....	22

4.5. Cinética de crescimento e produção de biossurfactantes pelos isolados.....	31
4.6. Efeito dos osmoprotetores sobre o crescimento de termófilos.....	35
4.7. Identificação dos isolados .....	37
6. ANEXOS .....	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Alguns microrganismos produtores de biossurfactantes e seus respectivos grupos
- Tabela 2.** Datas e temperaturas por ocasião das retiradas das amostras para triagem e isolamento de bactérias termófilas
- Tabela 3.** Datas e concentração de NaCl por ocasião das retiradas das amostras para triagem e isolamento de bactérias halotolerantes
- Tabela 4.** Datas, temperaturas e concentração de NaCl por ocasião das retiradas das amostras para triagem e isolamento de bactérias poliextremófilas
- Tabela 5.** Número de UFC g<sup>-1</sup> de termófilos obtidos em plaqueamento por *spread plate*
- Tabela 6.** Número de UFC g<sup>-1</sup> de halotolerantes obtidos em plaqueamento por *spread plate*
- Tabela 7.** Resultado dos testes do Colapso da Gota e do Espalhamento de Óleo quando os microrganismos foram cultivados em diferentes temperaturas e diferentes meios de cultura, sob agitação de 200 rpm durante 120 h
- Tabela 8.** Resultado da tensão superficial dos 41 isolados produtores de biossurfactantes quando os microrganismos foram cultivados em diferentes temperaturas e diferentes meios de cultura, sob agitação de 200 rpm durante 72 h
- Tabela 9.** Valores de velocidade específica de crescimento e DO<sub>600</sub> máxima dos quatro isolados que apresentaram maior concentração de biossurfactantes surfactina equivalente
- Tabela 10.** Identificação dos isolados produtores de biossurfactantes pelo perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos com base na biblioteca do método ITSA 1 e por sequenciamento e comparação entre as seqüências de rDNA 16S no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Curvas de crescimento dos sete isolados que apresentaram maior produção de biossurfactantes avaliada como surfactina equivalente. Os microrganismos foram cultivados a 40 °C (A, B, C,D) e a 70 °C (E, F, G), sob agitação de 200 rpm durante 72 h. Os valores de pH, ao final do cultivo, foram, respectivamente, 8,2; 8,8; 8,2; 8,8; 8,5; 7,0 e 7,3.
- Figura 2.** Relação entre a tensão superficial e o halo formado pelo teste do Espalhamento de Óleo dos isolados (A) T1A8C, (B) T1A55C, (C) T1A63D, (D) S1A1C, (E) T4A24DO e (F) T4A45DO. Os microrganismos foram cultivados à 40°C (A, B, C, D) e a 70 °C (E, F), sob agitação de 200 rpm durante 72h. Os valores de pH obtidos, ao final, foram de 8,8; 8,3; 8,8; 8,2; 7,3 e 7,0, respectivamente.
- Figura 3.** Curva de crescimento dos isolados (A) T4A24 e TA24DO, (B) T4A45 e T4A45CDO. DO indica a presença de osmoprotetores (glicina betaína e prolina). Os microrganismos foram cultivados nas temperaturas de 60 °C, 65 °C, 70 °C e 75 °C, sob agitação de 200 rpm durante 72h em frascos erlenmeyers de 150 mL contendo 50 mL de meio mineral 1.
- Figura 4.** Pilha na qual foi retirada a amostra para análise e estudo. Usina de Reciclagem e Compostagem de Lixo do município de Coimbra, Minas Gerais.
- Figura 5.** Diversidade morfológica das colônias de bactérias termófilas. Imagem a esquerda obtida de crescimento a 40 °C, da direita, a 65 °C (T3A15C).
- Figura 6.** Secreção de substância extracelular polimérica por bactéria crescendo a 65 °C (T3A15C), apontado pela seta.
- Figura 7.** Colônia de crescimento rápido, incubada a 65 °C/24 h (T3A1C).
- Figura 8.** Dendrograma construído com base na Distância Euclidiana dos perfis de ácidos graxos dos isolados obtidos de material de compostagem, analisados pelo método ITSA 1.00 (MIDI).

## RESUMO

Lopes, Leonardo Lourenço, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2014. **Isolamento e triagem de microrganismos termófilos e halotolerantes produtores de biossurfactantes.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Coorientadores: Célia Alencar de Moraes, Maurício Dutra Costa e Wendel Batista da Silveira.

Os biossurfactantes são compostos anfipáticos que possuem aplicações potenciais em diversas áreas. São considerados atóxicos e biodegradáveis, além de exibirem ótimas propriedades de superfície, como abaixamento de tensão superficial e da tensão entre duas fases imiscíveis (tensão interfacial) e excelente capacidade de emulsificação. Esses compostos têm composição variada, a qual depende do tipo de microrganismo que os produz e das condições de cultivo. O presente trabalho visou o isolamento e a triagem de microrganismos extremófilos obtidos a partir de material de compostagem de resíduos sólidos urbanos com potencial para a produção de biossurfactantes. Foram obtidos 340 isolados, dos quais 37 produziram biossurfactante, em temperatura que variou de 40 °C a 70 °C e em meio de cultivo com concentração de NaCl de 50 g L<sup>-1</sup>. Foi estimada a velocidade específica de crescimento dos quatro isolados que apresentaram maior capacidade de produção de biossurfactantes, sendo que o isolado T1A63D apresentou maior velocidade de crescimento ( $\mu = 0,83$ ). A maior concentração de biossurfactantes, expressa como surfactina equivalente, foi detectado no isolado S1A1C (1295 mg L<sup>-1</sup>) em meio TSB. O uso dos solutos compatíveis mostrou-se eficiente para o isolamento de hipertermófilos que crescem a 70 °C, demonstrando que esses osmoprotetores desempenham papel relevante na sobrevivência dos microrganismos crescendo em altas temperaturas.

## ABSTRACT

Lopes, Leonardo Lourenço, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2014. **Isolation and screening of microorganisms thermophiles and halotolerants producers of biosurfactants.** Advisor: Marcos Rogério Tótola. Co-advisors: Célia Alencar de Moraes, Maurício Dutra Costa and Wendel Batista da Silveira.

Biosurfactants are amphipathic compounds that have potential applications in various fields, considered non-toxic and biodegradable, and exhibit excellent surface properties such as surface tension and lowering the tension between two immiscible phases (interfacial tension) and excellent emulsifying capacity. These compounds are of variable composition which depends on the type of microorganism which produces and cultivation conditions. This study aimed at the isolation and screening extremophile microorganisms obtained from compost of municipal solid waste with potential for the production of biosurfactants were obtained 340 isolates, of which 37 produced biosurfactant in temperature ranging from 40 ° C to 70 °C and in culture medium with a concentration of 50 g L<sup>-1</sup> NaCl. The specific growth rate was estimated from the four isolates had higher biosurfactants production capacity, and the isolated T1A63D had the highest growth rate ( $\mu = 0.83$ ). The highest concentration of biosurfactants, expressed as equivalent surfactin, was detected in isolated S1A1C (1295 mg L<sup>-1</sup>) in TSB medium. The use of compatible solutes was efficient for the isolation of hyperthermophilic growing at 70 ° C, showing that these osmoprotectors play an important role in the survival of microorganisms growing at high temperatures.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de microrganismos pelo homem data de séculos antes de Cristo. Microrganismos são utilizados na alimentação, na indústria, na medicina, na remediação de ambientes contaminados, na agricultura, no tratamento de resíduos, na produção de enzimas, antibióticos, etanol, entre outros. Isto se deve à alta diversidade metabólica e fisiológica apresentada por esses seres vivos. Apesar da ampla aplicação de microrganismos pelo homem, um grupo que tem sido negligenciado é o dos extremófilos, organismos adaptados a crescerem em ambientes considerados inóspitos, como aqueles com altas ou baixas temperaturas, alta pressão, alta concentração de NaCl, dentre outros (O'Connor, 2013).

Uma das aplicações atuais dos microrganismos é na recuperação melhorada do petróleo (MEOR, *Microbial Enhanced Oil Recovery*). Os microrganismos, especialmente os procariotos, crescem exponencialmente e produzem metabólitos diversos, tais como gases, ácidos, biossurfactantes e biopolímeros. Os biossurfactantes, em particular, têm sido intensamente aplicados em estudos de recuperação terciária de petróleo, atuando sobre a redução da tensão interfacial entre o óleo contido no meio poroso e o líquido injetado nos reservatórios para forçar o deslocamento do óleo neles contido (Fernandes, 2011; Parreira, 2009; Batista 2008). Para serem aplicáveis no processo de recuperação terciária de petróleo, os biossurfactantes devem manter atividade de superfície nas condições extremas encontradas nos reservatórios, geralmente caracterizados por elevada concentração de sal, altas temperaturas e elevada pressão. Além de serem potencialmente aplicáveis na recuperação terciária de petróleo, os biossurfactantes são empregados para diversos outros fins, a exemplo do tratamento de borras oleosas, lavagem de solos contaminados com compostos orgânicos e metais, nas indústrias de cosméticos, de alimentos, de têxteis, na farmacologia, dentre outros (Araujo *et al.*, 2013). Em razão de seu amplo espectro de aplicações, há um interesse constante na descoberta de novas moléculas orgânicas naturais com atividade de superfície (biossurfactantes).

Este trabalho objetivou o isolamento e triagem de microrganismos termófilos e halotolerantes obtidos a partir de material de compostagem de resíduos sólidos urbanos com potencial para a produção de biossurfactantes.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Microrganismos extremófilos

Extremófilos (*extremo* = que atingiu o grau máximo, *philos* = afinidade) são microrganismos que vivem em condições extremas do ponto de vista do ser humano, como ambientes altamente salinos, com altas ou baixas temperaturas, com pH elevado ou baixo, com altas ou baixas pressões e alta radiação. Um organismo que cresce bem em um ambiente extremo é um extremófilo; em mais de um ambiente extremo, é denominado poliextremófilo (Rothschild Mancinelli, 2001).

As determinações para que um microrganismo se enquadre no grupo dos extremófilos são antropocêntricas. Cientificamente, há duas perspectivas: uma evolutiva e outra ecológica. Na perspectiva evolutiva, sob a óptica do meio ambiente mais antigo para a vida definindo o que é 'normal', considera-se que a vida surgiu num em um ambiente hidrotermal anóxico com alta temperatura - qualquer meio que se desvie deste seria considerado 'extremo'. Por exemplo, para manter-se quimicamente em meio aquoso, as células precisa de temperatura, pH e solutos balanceados, um controle preciso sobre as biomoléculas e correntes elétricas e uma capacidade de reparar alguns possíveis danos. Existem certas condições que destruirão as biomoléculas, tais como a dessecação, a radiação e o oxigênio. Esta última condição, o oxigênio, forma espécies reativas de oxigênio que causam danos oxidativos aos ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (TYRELL, 1991; NEWCOMB e LOEB, 1998). Assim considerado, os humanos e todos os outros seres aeróbios são extremófilos.

Sob a perspectiva ecológica, é interessante questionar: os extremófilos realmente têm afinidade (do grego *philos*) por um ambiente extremo ou podem meramente tolerá-los? Na prática, este último é claramente mais fácil de se determinar experimentalmente, enquanto que num sentido biológico o primeiro tem uma certa simplicidade biológica e linguística. Nas últimas décadas do século XX, diversos organismos 'extremoafins' verdadeiras foram encontradas, permitindo assim a pureza linguística (ROTHSCHILD e MANCINELLI, 2001).

Mas ressalta-se que é comum para algumas condições ambientais extremas (como por exemplo a radiação, o vácuo ou concentrações de metais) para incluir organismos que toleram em vez de afinidade ao meio ambiente.

Também é interessante se questionar: um organismo para ser extremófilo o deve ser durante todas as fases da vida e em todas as condições? A bactéria *Deinococcus radiodurans*, que apresenta altíssima resistência à radiação, é amplamente considerada como um extremófilo por excelência. No entanto, a resistência à radiação em *D. radiodurans* é severamente diminuída na fase estacionária em comparação com a fase logarítmica de crescimento (MINTON, 1994), sob altas concentrações aumentadas de manganês ( $Mn^{+2}$ ) com congelamento ou secagem (CHOW e TAN, 1990) e em condições de limitação nutricional (VENKATESWARAN *et al.*, 2000). Esporos (por exemplo, de *Bacillus subtilis*), sementes de plantas e estágios de ovo (por exemplo, do camarão) são muito mais resistentes a condições ambientais extremas do que as formas vegetativas. Muitas espécies de árvores, de sapos, de insetos e de peixes podem tolerar temperaturas extremamente baixas durante o inverno, como resultado das mudanças sazonais na sua fisiologia. Os Tardigrada (filo de pequenos animais segmentados relacionados ao filo Arthropoda e conhecidos como 'ursos de água') no estado *tun* (em forma de barril), podem sobreviver a temperaturas que variam de  $-253^{\circ}C$  a  $151^{\circ}C$  (SEKI e TOYOSHIMA, 1998).

Microrganismos extremófilos são encontrados nos três domínios da vida. Apesar de todos os hipertermófilos pertencerem aos domínios *Archaea* e *Bacteria*, é comum encontrarem-se eucariotos psicrófilos, acidófilos, alcalifílicos, piezófilos (ou barófilos), xerófilos e halófilos (que crescem em condições de baixas temperaturas, baixo pH, alto pH e sob altas pressão, desidratação e alta concentração de NaCl, respectivamente) (Rothschild e Mancinelli, 2001). No grupo dos extremófilos estão incluídos organismos multicelulares, havendo até mesmo vertebrados que são psicrófilos.

### **2.1.1. Microrganismos termófilos e hipertermófilos**

Os (hiper)termófilos (do grego *hyper* = acima; *termos* = calor, *philos* = afinidade) são aqueles microrganismos capazes de se reproduzir em

ambientes com altas temperaturas. São divididos em dois grupos: termófilos (que apresentam temperatura de crescimento entre 40-69 °C, com ótimo de 60 °C) e hipertermófilos (que apresentam temperatura de crescimento entre 65-99 °C, com ótimo de 88 °C) (Madigan *et al.*, 2011).

Altos valores de temperatura propiciam uma série de empecilhos ao desenvolvimento da vida. As moléculas orgânicas tendem a ser inativadas quando expostas a altas temperaturas, o que dificulta a manutenção das atividades celulares. Dentre os principais efeitos da exposição de organismos vivos a altas temperaturas, destacam-se a desnaturação de proteínas, associada à perda das estruturas secundária, terciária e quaternária; a degradação dos ácidos nucleicos (ditada pela composição dos seus ácidos nucleicos, uma vez que ligações adenina-timina são menos termoestáveis que as ligações citosina-guanina, e também pelo seu tamanho); a desnaturação das enzimas, que perdem sua atividade catalítica, e o aumento da fluidez da membrana, que permite que compostos saiam e/ou entrem na célula livremente, diminuindo ou aumentando sem controle sua concentração intracelularmente, levando a célula à morte (Driessen *et al.*, 1996).

Existem várias estratégias utilizadas pelos microrganismos termófilos para se adaptarem a ambientes com altas temperaturas, como a termoestabilidade de proteínas e enzimas, resultante do aumento de interações não-covalentes entre os aminoácidos, que mantêm a estrutura da cadeia peptídica. Essa estabilização térmica permite o funcionamento normal das atividades celulares em temperaturas de até 142 °C (Rotschild e Mancinelli, 2001). Em temperaturas de até 107 °C, a fita dupla de DNA pode permanecer estável (Marguete Forterre, 1994). Entretanto, em temperaturas acima dessa, o DNA é degradado por diversos mecanismos, sendo que o principal é a remoção de bases púricas (depurinização), o que leva à sua clivagem (Lindahl, 1993). O DNA dos termófilos contém uma DNA girase reversa, que aumenta o ponto de fusão por meio da produção de um enovelamento superpositivo no DNA, proporcionando estabilidade sob altas temperaturas (Lopez, 1999). Os hipertermófilos possuem ainda eficientes mecanismos de reparo de DNA, e mesmo as moléculas de RNA, que tendem a ser bastante instáveis a altas temperaturas, são protegidas por mecanismos que resguardam funcionalidade dos rRNAs e os mRNAs (Bernardes, 2013).

Algumas proteínas especializadas, conhecidas como chaperonas, são produzidos por esses microrganismos, que ajudam a redobrar as proteínas em sua forma normal, restaurando assim as suas funções (Laksanalamai e Robb, 2004; Singhet *et al.*, 2010). Além dessas estratégias, bactérias e arqueias termófilas conseguem sobreviver em altas temperaturas por aumentar as interações eletrostáticas, dissulfeto e hidrofóbicas em suas proteínas (Ladensteine Ren, 2006; Mathew *et al.*, 2008). Certas enzimas termófilas são estabilizadas por determinadas alterações de conformação (Fitter, 2003), ao passo que certos metais e sais inorgânicos também são relatados como fatores que conferem estabilidade térmica (Vieille Zeikus, 2001).

### **2.1.2. Microrganismos halófilos e halotolerantes**

Os halófilos (do grego *halo* = sal, *philos* = afinidade) são microrganismos encontrados em ambientes salinos, diferindo dos organismos halotolerantes, uma vez que são capazes de se reproduzir e desempenhar suas funções metabólicas de forma mais eficaz na presença de altas concentrações de NaCl. Há uma grande diversidade de organismos halófilos, tanto no grupo dos procariotos quanto no dos eucariotos. Esses organismos têm a capacidade de equilibrar a pressão osmótica em relação ao meio e resistir aos efeitos prejudiciais do NaCl. Dentre os organismos halófilos, há uma variedade de microrganismos heterotróficos e metanogênicos, tanto do domínio *Bacteria* quanto do domínio *Archaea*, adaptados a altas concentrações de NaCl. A adaptação a essa condição envolve diversos mecanismos moleculares, tais como enzimas que permanecem ativas em concentrações elevadas de sal (Dassarma e Dassarma, 2001).

Existem basicamente duas estratégias existentes nos microrganismos que os permitem superar o estresse osmótico gerado pela presença de altas concentrações de sal, a saber: 1) as células mantêm altas concentrações intracelulares de sal, com osmolaridade próxima ou igual à concentração externa sal (estratégia *salt-in*). Nesse caso, os componentes intracelulares devem ser adaptados para suportarem altas concentrações de sal; 2) as células mantêm baixas concentrações de sais em seu citoplasma (estratégia soluto compatível). A pressão osmótica é equilibrada pelo acúmulo intracelular de solutos compatíveis, não havendo a necessidade de que os componentes

intracelulares sejam especialmente adaptados a altas concentrações salinas (Bayley e Morton, 1978).

A estratégia *salt-in* é usada por dois grupos filogeneticamente não-relacionados: halófilos aeróbios do domínio *Archaea*, ordem Halobacteriales (Bayley e Morton, 1978; Lanyi, 1974) e halófilos anaeróbios do domínio *Bacteria*, ordem Haloanaerobiales (Oren, 1986; Oren *et al.*, 1997). Nesses grupos, não foi identificado nenhum tipo de soluto compatível e, na maioria dos estudos realizados, foi constatado que a concentração intracelular de íons é semelhante à concentração do ambiente em que esses microrganismos se encontram. Suas enzimas e demais componentes celulares são adaptados à alta concentração de sal. Langworthy *et al.* (1974) observaram que um dos mecanismos de adaptação é a ocorrência de um excesso de aminoácidos com caráter ácido e a existência de poucos aminoácidos hidrofóbicos em suas proteínas.

Nos outros microrganismos halófilos extremos e halotolerantes, o equilíbrio osmótico é estabelecido por pequenas moléculas sintetizadas pela célula ou captadas do meio, quando disponíveis. A estratégia de soluto compatível não implica, necessariamente, em uma adaptação de certas proteínas a esses solutos.

## **2.2 Solutos compatíveis**

Conhecidos também como osmoprotetores ou osmólitos, os solutos compatíveis são definidos como solutos que, em concentrações mais elevadas, permitem que enzimas funcionem eficientemente (Bashir, 2014). Uma grande diversidade de solutos compatíveis é encontrada nesses microrganismos, dentre as quais encontram-se alguns polióis (como glicerol e arabinitol), açúcares e seus derivados (sacarose, trealose, glicosilglicerol), aminoácidos e derivados de amina quaternária, como a glicina betaína.

Os solutos compatíveis são tipicamente compostos de baixo peso molecular, altamente solúveis em água, sem carga ou com propriedades zwitteriônicas em pH fisiológico. Alguns solutos compatíveis são mais eficientes do que outros na proteção das enzimas contra os efeitos da elevada concentração de sal (Vargas *et al.*, 2008) e elevada temperatura (Bashir, 2014).

A natureza das interações dos solutos compatíveis com as proteínas não é bem conhecida, mas é sabido que a concentração intracelular de solutos compatíveis orgânicos permite um alto grau de adaptação das células a mudanças na concentração de sal e temperatura no ambiente onde essas se encontram (Galinski, 1995; Vargas *et al.* 2008; Bashir, 2014).

Muitos microrganismos são capazes de absorver solutos compatíveis pré-formados a partir do ambiente onde se encontram através de sistemas de transporte de alta afinidade. Cinco sistemas de captação de osmoprotetores osmoticamente reguladas (OpuA, OpuB, OpuC, OpuD e OpuE) operam em bactérias gram-positivas encontradas no solo, como *Bacillus subtilis*, permitem a captação coletiva de 13 solutos compatíveis ou o precursor biossintético de glicina betaína (NAU-WAGNER *et al.*, 2012). A absorção e a alta capacidade de acumular intracelularmente solutos compatíveis, em especial, a glicina betaína, fornece osmoproteção eficaz para as células de *B. subtilis*, e permite o seu crescimento ao longo de uma ampla gama de concentração de s externas. Além da aquisição eficaz de solutos compatíveis, *B. subtilis* pode também sintetizar glicina betaína a partir do precursor colina, por meio das enzimas GBSB e GbsA; a colina é absorvida pela célula através dos sistemas de transporte ABC (OpuB e OpuC) (HOLTMANN e BREMER, 2004; NAU-WAGNER *et al.*, 2012).

### **2.3. Compostagem**

O termo compostagem refere-se à decomposição da matéria orgânica por microrganismos heterotróficos, sob condições controladas de aeração e temperatura, sob as quais o processo de decomposição ocorre de forma acelerada. O produto desse processo é denominado composto orgânico. O termo composto orgânico pode ser aplicado ao produto compostado, estabilizado e higienizado, que é benéfico para a produção vegetal (Zucconi e Bertoldi, 1987). Quando adicionado ao solo, o composto orgânico melhora as suas características biológicas, físicas e químicas.

A compostagem é normalmente realizada em pátios nos quais o material é disposto em montes conhecidos como pilhas ou leiras de compostagem (Bidone, 1999).

O processo é desenvolvido por uma diversificada população de microrganismos, realizada em duas fases distintas: a primeira, fase de degradação ou bioestabilização e a segunda, fase de maturação ou humificação (Heidemann *et al.*, 2007).

Na fase de degradação predominam os microrganismos mesófilos. Calor vai sendo liberado à medida que as reações da biodegradação da matéria orgânica vão ocorrendo, diminuindo assim a população de mesófilos e proliferando, com mais intensidade, os termófilos. Quando a maior parte do substrato orgânico tiver sido transformada, a temperatura diminui, e os mesófilos voltam a dominar a comunidade microbiana. A bioestabilização dura aproximadamente noventa dias. Além da máxima degradação, nessa fase ocorre também a eliminação de microrganismos patogênicos pela ação da temperatura. Ocorre nessa fase um grande consumo de oxigênio, tornando-se necessário grande aeração do sistema (Heidemann *et al.*, 2007).

Ocorrida a primeira fase, inicia-se a fase de maturação, na qual a degradação e a eliminação de microrganismos patogênicos continuam. A humificação dos materiais se dá por meio de transformações químicas, observando-se baixa atividade microbiológica, necessitando-se assim de menor aeração. A coloração torna-se mais escura, sem o odor inicial. A maturação tem a duração de aproximadamente trinta dias (Heidemann *et al.*, 2007).

## **2.4. Biossurfactantes**

Biossurfactantes (*bio* = vida; surfactante = derivação da expressão *surface active agent*, agente com atividade superficial) são moléculas produzidas por microrganismos com capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido (Jönsson *et al.* 1998; Waters, 1991). Essas moléculas possuem características anfipáticas, isso é, são formadas por uma porção hidrofílica e por uma porção hidrofóbica. Isso permite com que haja uma diminuição da tensão superficial e uma capacidade de emulsificação.

Os biossurfactantes são produzidos como metabólitos secundários derivados das vias metabólicas de microrganismos. O interesse por esses compostos resulta de várias características desejáveis quando se comparam

com os surfactantes sintéticos, a exemplo da sua baixa toxicidade, biodegradabilidade, efetividade em concentrações muito baixas, manutenção da atividade em condições extremas de temperatura, concentração de NaCl e pH, dentre outras (Sousa *et al.*, 2012).

#### **2.4.1 Grupos de microrganismos produtores de biossurfactantes**

Bactérias e arqueas são os principais microrganismos responsáveis pela produção de biossurfactantes, mas também há fungos produtores. Esses microrganismos geralmente são isolados do solo, da água do mar, do sedimento marinho e de áreas contaminadas com óleos (Maier, 2003).

#### **2.4.2. Tipos de biossurfactantes**

Os biossurfactantes podem ser divididos em cinco grandes grupos: glicolipídeos; ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos; lipoproteínas e lipopeptídeos; poliméricos; particulados (Tabela 1).

Os glicolipídeos são os biossurfactantes mais conhecidos. São carboidratos combinados com ácidos alifáticos de cadeia longa ou ácidos hidroxialifáticos. A ligação é feita por meio de grupos éter ou éster. Entre os glicolipídeos, os mais conhecidos são os ramnolipídeos, trehalolipídeos e soforolipídeos.

Várias bactérias e leveduras produzem grandes quantidades de ácidos graxos e agentes tensoativos de natureza fosfolipídica durante o crescimento em n-alcenos (Cirigliano e Carman, 1985). O equilíbrio hidrofílico e lipofílico (HLB) está diretamente relacionado com o comprimento da cadeia de hidrocarboneto em suas estruturas.

Um grande número de lipopeptídeos cíclicos, incluindo antibióticos decapeptídicos (gramicidina) e antibióticos lipopeptídicos (polimixinas) são produzidos por microrganismos. Esses consistem de um lipídeo ligado a uma cadeia polipeptídica (Muthusamy *et al.*, 2008).

Os biossurfactantes poliméricos mais estudados são o emulsan, o liposan, o alasan, o lipomanan e outros complexos de polissacarídeos e

proteínas. São heteropolissacarídeos anfipáticos polianiônicos com capacidade emulsificante (Zosim *et al.*, 1982).

Os biossurfactantes particulados são encontrados extracelularmente em vesículas na membrana plasmática. Atuam formando microemulsões de hidrocarbonetos, e desempenham papel importante na absorção de alcanos por células microbianas (Kappeli e Finnerty, 1979).

**Tabela 1.** Alguns microrganismos produtores de biossurfactantes e seus respectivos grupos

<b>Tipo de biossurfactante</b>	<b>Microrganismo</b>
<b>Glicolipídeos</b>	
- ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i>
- trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
<b>Lipopeptídeos e lipoproteínas</b>	
- peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
- viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
- surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
- subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
- gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
- polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
<b>Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos</b>	
- ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
- lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
- fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
<b>Surfactantes poliméricos</b>	
- emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- liposan	<i>Candida lipolytica</i>
- carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- manana-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
<b>Surfactantes particulados</b>	
- vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- células	Várias bactérias

Adaptada de Desai e Banat (1997).

### 2.4.3. Aplicações dos biossurfactantes

Uma das aplicações dos biossurfactantes é em processo de biorremediação de ambientes contaminados por derramamentos de petróleo e seus derivados (tanto na água quanto no solo) (Banat, 1995a), por pesticidas

(como hexaclorociclohexano, DDT e ciclodienos) (Karanth *et al.*, 1999) e também por metais pesados tóxicos e elementos radioativos (como urânio, cádmio e chumbo) (Miller, 1995).

Na cadeia produtiva do petróleo, os biossurfactantes têm sido estudados visando à sua utilização na recuperação do petróleo melhorada por microrganismos (MEOR, *Microbial Enhanced Oil Recovery*). Consiste em uma tecnologia de recuperação terciária do petróleo que utiliza microrganismos ou produtos de seu metabolismo para a recuperação de óleo residual. Os microrganismos, os seus produtos ou nutrientes requeridos para o crescimento de microrganismos selvagens são injetados diretamente no reservatório (Banat, 1995).

Os biossurfactantes podem ser utilizados ainda para facilitar a limpeza de borras oleosas que se acumulam em reservatórios de óleo, uma vez que sua remoção requer a lavagem com solventes ou limpeza manual, ambas perigosas, demoradas e caras. Utilizando-se biossurfactantes, ocorre uma diminuição na viscosidade e a formação de emulsões óleo/água, que facilita o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru após a quebra da emulsão (Cameotra e Makkar, 2010).

Há também interesse na área farmacológica, com aplicações farmacêuticas como a inibição da formação de coágulos; formação de canais iônicos em membranas; atividades antibacteriana e antifúngica; atividades antiviral e antitumoral; inibição da adesão de bactérias entéricas patogênicas e agentes antibiofilmes para reduzir a formação de biofilmes em cateteres (Araújo *et al.*, 2013).

Na indústria de alimentos, os biossurfactantes são utilizados como emulsificantes na preparação de pães, derivados de carne e molhos prontos para salada (Barros *et al.*, 2007).

Alguns dos biossurfactantes são interessantes para a agricultura, pois podem ser utilizados como herbicidas e pesticidas (Lima e Contiero, 2009).

As características anfipáticas dos biossurfactantes permitem que os mesmos possam ser usados em produtos cosméticos e de higiene, como cremes faciais, batons, maquiagens e hidratantes para pele e cabelos (Tuleva *et al.*, 2002).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) do Departamento de Microbiologia (DMB) localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

#### 3.1. Local e coleta das amostras

A amostra para isolamento consistiu de material de compostagem de resíduos sólidos urbanos, proveniente da Usina de Reciclagem e Compostagem de Lixo do município de Coimbra, Minas Gerais (Anexo, figura 1). Esse material foi coletado na fase termófila do processo de compostagem. A amostra foi peneirada em malha de 2 mm e mantida resfriada em câmara fria a 5 °C.

#### 3.2. Isolamento de termófilos

Cinco gramas de material foram submetidos a uma rampa de temperatura (Tabela 2). Após cada período de tratamento, uma amostra de 1g de solo foi retirada e misturada em 9,5 mL de solução de pirofosfato de sódio 1 g L<sup>-1</sup> e Tween 80 0,05%. Após agitação em agitador tipo vortex por 20 s, 100 µL foram retirados e misturados em 900 µL para realização de diluição seriada. Uma alíquota de 100 µL foi plaqueada por *spread plate* em meio TSA sólido a 10% e a 100% da concentração recomendada pelo fabricante, seguindo-se incubação em estufa por 24 h. As placas foram incubadas em jarras hermeticamente fechadas contendo frascos tipo béqueres de 50 mL com 40 mL de água destilada, a fim de se evitar o ressecamento dos meios de cultura por perda de água.

**Tabela 2.** Datas e temperaturas por ocasião das retiradas das amostras para triagem e isolamento de bactérias termófilas

Dias de tratamento	Temperatura
0-2	40 °C
2-4	55 °C
4-6	65 °C
6-8	70 °C

Dois mmol L<sup>-1</sup> de glicina betaína e prolina foram acrescentados ao material de compostagem incubado e ao meio de cultura, para avaliação do efeito desses osmoprotetores no isolamento dos microrganismos nas temperaturas de 65 °C e 70 °C.

### 3.3. Isolamento de halotolerantes

Cinco gramas de material foram submetidos a diferentes concentrações salinas e mantidos à temperatura de 40 °C (Tabela 3). Após cada período de tratamento, uma amostra de 1 g de solo foi retirada e adicionada a 9,5mL de solução de pirofosfato de sódio 1 g L<sup>-1</sup> e Tween 80 0,05%, seguindo-se agitação em agitador tipo vortex por 20 s. 100 µL foram retirados e misturados em 900 µL do mesmo diluente para realização de diluição seriada. Uma alíquota de 100 µL foi plaqueada por *spread plate* em meio TSA sólido a 10% e a 100% da concentração recomendada pelo fabricante, acrescido de NaCl na concentração salina na qual o material foi incubado, seguindo-se incubação a 40 °C por 24h. Para as concentrações de 170 g L<sup>-1</sup> e 250 g L<sup>-1</sup> de NaCl, o tempo de incubação foi de 48h.

**Tabela 3.** Datas e concentração de NaCl por ocasião das retiradas das amostras para triagem e isolamento de bactérias halotolerantes

Dias de tratamento	Concentração de NaCl
0-2	50 g L <sup>-1</sup>
2-4	100 g L <sup>-1</sup>
4-6	170 g L <sup>-1</sup>
6-8	250 g L <sup>-1</sup>

### 3.4. Isolamento de poliextremófilos (termófilos e halotolerantes)

Cinco gramas de material em diferentes concentrações salinas foram submetidos a uma rampa de temperatura (Tabela 4). Após cada período de tratamento, uma amostra de 1 g de solo foi retirada e misturada em 9,5 mL de solução de pirofosfato de sódio 0,1% e Tween 80 0,05%, seguindo-se agitação em agitador tipo vortex por 20 s. 100 µL foram retirados e misturados em 900 µL para realização de diluição seriada. Uma alíquota de 100 µL foi plaqueada por *spread plate* em meio TSA sólido a 10% e a 100% juntamente com a concentração salina a qual foram incubadas, e mantida em estufa por 24 h.

**Tabela 4.** Datas, temperaturas e concentração de NaCl por ocasião das retiradas das amostras para triagem e isolamento de bactérias poliextremófilas

<b>Concentração de NaCl: 50 g L<sup>-1</sup></b>	
<b>Dias de tratamento</b>	<b>Temperatura</b>
0-2	55 °C
2-4	65 °C
4-6	70 °C
<b>Concentração de NaCl: 100 g L<sup>-1</sup></b>	
0-2	55 °C
2-4	65 °C
4-6	70 °C
<b>Concentração de NaCl: 170 g L<sup>-1</sup></b>	
0-2	55 °C
2-4	65 °C
4-6	70 °C
<b>Concentração de NaCl: 250 g L<sup>-1</sup></b>	
0-2	55 °C
2-4	65 °C
4-6	70 °C

### 3.5. Avaliação da produção de biosurfactantes

#### 3.5.1. Meios de cultivo

As colônias isoladas foram utilizadas para inocular tubos de cultura contendo 10 mL de Caldo Trypticase de Soja (TSB) e em dois tipos de Caldos Minerais (1 e 2).

O TSB (pH 7,0) continha (g L<sup>-1</sup>): hidrolisado pancreático de caseína, 17,0; hidrolisado papaínico de soja, 3,0; dextrose, 2,5; NaCl, 5,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,5.

Para cultivo no Meio Mineral 1 (Zhu *et al.*, 2012), originalmente proposto para produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa*, os isolados foram inicialmente cultivados em um meio de cultura contendo (g L<sup>-1</sup>): glicose, 20,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,0; NaCl, 1,1; KCl, 1,1; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2 (pH 7,0). Após 24h de cultivo, 200µL da cultura foram transferidos para o meio mineral, que continha (g L<sup>-1</sup>): óleo de soja, 80,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6,0; NaNO<sub>3</sub>, 3,0; NaCl, 1,1; KCl, 1,1; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2; CaCl<sub>2</sub> anidro, 0,2; solução de elementos-traços, 5 mL L<sup>-1</sup>. A composição da solução de elementos-traços foi (g L<sup>-1</sup>): FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 12,0; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 3,0; CoSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,0; MnSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 3,0.

O Meio Mineral 2 (Youssef *et al.*, 2004) (Meio E), originalmente proposto para produção de biossurfactantes por bactérias do gênero *Bacillus*, continha (g L<sup>-1</sup>): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,7; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 13,9; sacarose, 10,0; NaCl, 50,0; extrato de levedura, 0,5; NaNO<sub>3</sub> 1,0; MgSO<sub>4</sub>, 0,25; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10,0; EDTA, 0,005; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,03; NaCl, 0,01; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,001; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,001; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,001; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,0001; AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 0,0001; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,0001; ácido bórico, 0,0001; Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>, 0,00005; NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,00003 (pH 6,9).

Os tubos foram incubados por cinco dias sob agitação (200 rpm). A concentração de NaCl, a temperatura de incubação e a adição dos osmoprotetores foram as mesmas adotadas durante o isolamento de cada cepa avaliada. Após o período de cultivo, as amostras foram centrifugadas (10.000 x g por 10 minutos) e o sobrenadante foi recuperado para avaliação da presença de biossurfactantes, utilizando-se o método do Colapso da Gota (Bodour e Miller-Maier, 1998) e do Espalhamento de Óleo (Youssef *et al.* 2004).

### 3.5.2. Tensão superficial

As tensões superficiais das soluções de biossurfactantes foram avaliadas em tensiômetro *Dataphysics* DCAT 11 EC, com o auxílio do programa SCAT versão 3.2.0.84, utilizando-se o método da placa de *Wilhelmy* e o valor de 0,03 como valor-limite do desvio padrão.

### 3.5.3. Velocidade específica de crescimento

As velocidades específicas de crescimento foram avaliadas cultivando-se os isolados na mesma condição na qual foram obtidos, em frascos erlenmeyers de 500 mL contendo 250 mL do meio de cultura, sob agitação (200 rpm) por 72 h. O crescimento foi acompanhado por meio da avaliação da densidade óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ), das culturas com intervalos de 1 hora, utilizando-se um espectrofotômetro BioRad modelo SmartSpec™ 3000.

### 3.6. Análise do perfil de ácidos graxos

A análise do perfil de ácidos graxos dos isolados foi feita por cromatografia gasosa de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME, *Fatty Acid Methyl Ester*). Os FAME foram preparados utilizando-se o *kit Instant Fame* (MIDI Inc., Newark, DE), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram injetadas em um cromatógrafo a gás Agilent 7890A e a análise feita pelo programa MIDI Sherlock® (*Sherlock Microbial Identification System* da MIDI Inc. Newark, Delaware, USA), utilizando-se o método ITSA 1.0. Os perfis de ácidos graxos de cada isolado foram submetidos à análise de agrupamento, utilizando-se o mesmo software. Amostras que apresentaram valores de distância Euclidiana inferiores a 2,5 foram consideradas corridas do mesmo isolado. As que apresentaram valores acima de 2,5 foram consideradas como amostras de cepas distintas.

### 3.7. Identificação dos isolados

A identificação dos isolados foi realizada por sequenciamento e análise da sequência parcial do rDNA 16S. Uma colônia foi inoculada em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo TSB, seguindo-se incubação por 24 h a temperatura em que foram isolados e a 150 rpm.

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

A amplificação do fragmento parcial do rDNA 16S foi realizada utilizando-se *primers* universais para *Bacteria* 5F (5' – TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCA – 3') e 531 r (5' TACCGCGGCTGCTGGCAC- 3') (Hall *et al.* 2003).

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

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

### **3.8. Preservação dos isolados**

Os isolados selecionados foram cultivados em placas contendo meio sólido TSA 100% e incubados nas temperaturas nas quais foram isolados. Em seguida, foi realizada a repicagem das colônias para tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo TSB, seguindo-se incubação na mesma temperatura e a 150 rpm, por 24 h. 1 mL de cada amostra foi transferido para microtubos de 1,5 mL de capacidade e centrifugado a 12.400x g por um minuto. O sobrenadante foi

descartado e ao pélete foram adicionados 600 µL de caldo TSB e 400 µL de glicerol a 80%. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.9. Análise estatística**

Os dados experimentais foram apresentados como médias aritméticas de três repetições, com seus respectivos desvios-padrão. Os dados dependentes de efeito quantitativo foram avaliados por regressão. As análises foram feitas por meio da utilização do *software* MiniTab, versão 17.1.0 (2013).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Isolamento das bactérias termófilas

Após incubação de 24 h em meio TSA 10% e 100%, foi realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônia por grama de material de compostagem (Tabela 5).

**Tabela 5.** Número de UFC g<sup>-1</sup> de termófilos obtidos em plaqueamento por *spread plate* em ágar TSA 10% e TSA 100%

Temperatura	UFC g <sup>-1</sup>	
	TSA 10%	TSA 100%
40 °C	2,9x10 <sup>8</sup> (± = 0,2x10 <sup>8</sup> )	4,3x10 <sup>8</sup> (± = 1,0x10 <sup>8</sup> )
55 °C	7,7x10 <sup>7</sup> (± = 1,90x10 <sup>7</sup> )	1,7x10 <sup>8</sup> (± = 0,2x10 <sup>8</sup> )
65 °C	9,3x10 <sup>4</sup> (± = 2,5x10 <sup>4</sup> )*	3,7x10 <sup>5</sup> (± = 0,5x10 <sup>8</sup> )*
	9,0x10 <sup>4</sup> (± = 1,6x10 <sup>4</sup> )	3,2x10 <sup>5</sup> (± = 0,7x10 <sup>8</sup> )
70 °C*	2,6x10 <sup>5</sup> (± = 0,3x10 <sup>5</sup> )	2,9x10 <sup>5</sup> (± = 0,1x10 <sup>8</sup> )

\* O meio de cultivo para esse tratamento continha 2 mmol L<sup>-1</sup> de glicina betaína e prolina.

Foram obtidos 230 isolados. Após serem submetidos à análise do perfil de ácidos graxos, o número de cepas distintas foi reduzido para 100, sendo que 58 foram isoladas a 40 °C, 17 a 55 °C, 11 a 65 °C e 14 a 70 °C. Foram encontradas colônias com diferentes morfologias, algumas bem definidas, outras que se espalharam por grande área na placa (Anexo, figura 2).

Diversas colônias secretaram substâncias extracelulares poliméricas (EPS) (Anexo, figura 4), formando uma área transparente em torno das colônias. EPS servem como proteção a altas temperaturas e contra a desidratação dos microrganismos (Mezhoud *et al.*, 2014).

Alguns isolados (T3A1 e T3A29) apresentaram crescimento muito rápido, (Anexo, figura 6), ocupando grande área do meio de cultura após crescimento de 24 h.

Nas temperaturas de 65 °C e 70 °C, foram utilizados 2 mmol L<sup>-1</sup> de glicina betaína e prolina, a fim de se verificar os efeitos dos osmoprotetores no isolamento de termófilos. Os osmoprotetores foram também utilizados nos meios de cultura contendo NaCl nas concentrações de 170 g L<sup>-1</sup> e 250 g L<sup>-1</sup>.

Na temperatura de 65°C, não houve nenhuma diferença no número de UFC g<sup>-1</sup> nos meios de cultura que continham ou não os osmoprotetores (Tabela 5). Nos cultivos a 70 °C, houve desenvolvimento apenas na presença dos osmoprotetores. O resultado demonstra que os solutos compatíveis desempenham papel importante na termoproteção de alguns microrganismos quando cultivados em temperaturas elevadas.

#### 4.2. Isolamento das bactérias halotolerantes

O número de microrganismos cultiváveis no resíduo sólido urbano tratado com doses crescentes de NaCl em ágar TSA a 10% e a 100%, acrescidos de NaCl, variou entre zero (250 g L<sup>-1</sup> de NaCl) a 10<sup>8</sup> UFC g<sup>-1</sup> (50 g L<sup>-1</sup> de NaCl) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Número de UFC g<sup>-1</sup> de halotolerantes obtidos em plaqueamento por *spread plate* em ágar TSA 10% e TSA 100%

Concentração de NaCl	UFC g <sup>-1</sup>	
	TSA 10%	TSA 100%
50 g L <sup>-1</sup>	2,4x10 <sup>7</sup> (± = 0,4x10 <sup>7</sup> )	4,6x10 <sup>8</sup> (± = 0,6x10 <sup>8</sup> )
100 g L <sup>-1</sup>	3,4x10 <sup>8</sup> (± = 0,9x10 <sup>8</sup> )	4,3x10 <sup>7</sup> (± = 0,7x10 <sup>7</sup> )
170 g L <sup>-1</sup>	1,1x10 <sup>5</sup> (± = 0,3x10 <sup>5</sup> )	1,1x10 <sup>6</sup> (± = 0,1x10 <sup>6</sup> )
250 g L <sup>-1</sup>	0 (± = 0)	0 (± = 0)

Foram obtidos 90 isolados halotolerantes em ágar TSA 10% ou 100% acrescidos de NaCl. Após serem analisados quanto ao perfil de ácidos graxos, o número de cepas distintas foi reduzido a 23, sendo que 10 foram isoladas a 50 g L<sup>-1</sup>, 9 a 100 g L<sup>-1</sup> e 4 a 170 g L<sup>-1</sup>. Não houve crescimento nas placas com 250 g L<sup>-1</sup>, mesmo após incubação de 72 h. As colônias encontradas geralmente apresentaram tamanho muito reduzido, outras produziram grandes quantidades de EPS, que servem como proteção contra a alta concentração de NaCl (Llamas *et al.*, 2012).

Substâncias extracelulares poliméricas têm despertado um grande interesse por parte dos biotecnologistas, já que podem ser aplicadas em diversos setores como farmacêutica, alimentícia, cosmética e também na indústria do petróleo, em que emulsificantes, viscosificantes e agentes quelantes são requeridos (Llamas *et al.*, 2012).

Nos meios que continham NaCl, na concentração de 170 g L<sup>-1</sup>, houve maior crescimento de células quando foram adicionados os osmoprotetores. Nas placas contendo meio de cultura sem osmoprotetores, a contagem ficou abaixo de 25 (média de 14 colônias na diluição 10<sup>-1</sup>). Na concentração de 250 g L<sup>-1</sup>, não houve crescimento, independentemente da presença de osmoprotetores.

### **4.3. Isolamento das bactérias poliextremófilas**

O número de colônias em todas as placas não ficou entre a faixa estabelecida de confiança, que é entre 25 e 300 colônias, mesmo em baixas diluições (o número de colônias não ultrapassou 10). Foram obtidos 20 isolados. Após serem analisados quanto ao perfil de ácidos graxos, o número de cepas distintas foi reduzido a 9, sendo que 6 foram isoladas a 50 g L<sup>-1</sup> e 3 a 100 g L<sup>-1</sup>, ambos a 55 °C. Não houve crescimento nas placas com as concentrações de 170 g L<sup>-1</sup> e 250 g L<sup>-1</sup>, nem nas temperaturas de 65 °C e 70 °C.

### **4.4. Produção de biossurfactantes**

Dos 116 isolados testados nos três diferentes meios, no caldo TSB, 24 isolados produziram biossurfactantes a 40 °C, 1 a 65 °C e 4 com concentração de NaCl de 50 g L<sup>-1</sup> a 40 °C. No Meio Mineral 1, 6 cepas produziram biossurfactantes a 70 °C. Já no meio mineral 2, 5 cepas produziram biossurfactantes em concentração de NaCl de 50 g L<sup>-1</sup> a 40 °C (Tabela 7).

A maior proporção de isolados capazes de produzir biossurfactantes em caldo TSB pode sugerir que altas temperaturas e/ou altas concentração de NaCl inibe alguma via de biossíntese dos microrganismos, impedindo-os de crescer nos meios minerais ou reduzindo sua taxa de crescimento (Frock e Kelly, 2012).

Foram utilizados dois testes distintos para a avaliação da produção de biossurfactantes, a fim de se obter um maior espectro de isolados, conforme sugerido por Walter *et al.* (2010).

**Tabela 7.** Produção de biossurfactante por microrganismos termófilos e halotolerantes em caldo TSB e em meios minerais, em diferentes temperaturas e na presença de NaCl

1. Caldo TSB

Isolado	Temperatura (°C)	Concentração de NaCl (g L <sup>-1</sup> )	Teste do colapso <sup>2</sup>	Diâmetro do halo (cm)	Atividade de biossurfactante (mg L <sup>-1</sup> surfactina equivalente)	Tensão superficial (mN/m)
T1A26C	40	0	-	1,6 (0,5) <sup>1</sup>	< 0,15	50,7±0,03
T1A82D	40	0	+	2,5 (0,0)	44,43	43,3±0,03
T1A54C	40	0	-	1,2 (0,2)	< 0,15	48,9±0,03
T1A98D	40	0	-	0,9 (0,2)	< 0,15	42,9±0,03
T1A29C	40	0	-	-	-	-
T1A46C	40	0	-	3,0 (0,1)	108,71	57,2±0,03
T1A12C	40	0	-	2,5 (0,6)	37,29	57,7±0,03
T1A30C	40	0	-	1,5 (0,1)	< 0,15	37,4±0,03
T1A8C	40	0	+	8,0 (1,5)	823,00	35,2±0,02
T1A7C	40	0	-	-	-	-
T1A56C	40	0	+++	7,6 (2,0)	773,00	41,1±0,03
T1A10C	40	0	-	-	-	-
T1A51C	40	0	-	-	-	-
T1A6C	40	0	+	1,2 (0,2)	< 0,15	60,7±0,03
T1A41C	40	0	-	2,0 (0,1)	< 0,15	61,8±0,03
T1A96D	40	0	+	3,2 (0,6)	144,43	48,4±0,03
T1A91D	40	0	+	1,5 (0,0)	< 0,15	56,1±0,03
T1A4C	40	0	+	4,5 (0,7)	330,14	61,9±0,03
T1A53C	40	0	+++	5,8 (0,4)	508,71	27,6±0,03
T1A63D	40	0	+++	10,0 (1,4)	1115,86	28,6±0,03
T1A3C	40	0	+	1,9 (0,1)	< 0,15	57,7±0,03
T1A1C	40	0	+	2,4 (0,4)	23,00	34,8±0,03
T1A84D	40	0	-	-	-	-
T1A44C	40	0	+	0,3 (0,0)	< 0,15	47,1±0,03
T1A45C	40	0	-	-	-	-
T1A78D	40	0	-	-	-	-
T1A14C	40	0	-	-	-	-
T1A95D	40	0	-	-	-	-
T1A21C	40	0	-	-	-	-
T1A55C	40	0	+++	11,1 (0,4)	1273,00	28,6±0,03
T1A33C	40	0	-	-	-	-
T1A13C	40	0	-	-	-	-
T1A50C	40	0	-	-	-	-
T1A17C	40	0	-	-	-	-
T1A24C	40	0	-	-	-	-
T1A80D	40	0	-	-	-	-
T1A9C	40	0	-	-	-	-
T1A25C	40	0	-	-	-	-
T1A15C	40	0	-	-	-	-
T1A42C	40	0	-	-	-	-
T1A83D	40	0	-	1,7 (0,4)	< 0,15	41,4±0,03
T1A79D	40	0	-	-	-	-
T1A5C	40	0	-	-	-	-
T1A94D	40	0	-	-	-	-

T1A92D	40	0	-	-	-	-
T1A49C	40	0	+++	1,2 (0,0)	< 0,15	39,0±0,03
T1A18C	40	0	-	-	-	-
T1A48C	40	0	-	-	-	-
T1A77D	40	0	+	0,7 (0,2)	< 0,15	46,9±0,03
T1A35D	40	0	-	-	-	-
T1A97D	40	0	+	0,6 (0,1)	< 0,15	37,9±0,03
T1A36C	40	0	-	-	-	-
T1A2C	40	0	-	-	-	-
T1A38C	40	0	-	-	-	-
T1A62D	40	0	-	-	-	-
T2A15C	55	0	-	-	-	-
T2A8C	55	0	-	-	-	-
T2A5C	55	0	-	-	-	-
T2A28D	55	0	-	-	-	-
T2A10C	55	0	-	-	-	-
T2A30D	55	0	-	-	-	-
T2A3C	55	0	-	-	-	-
T2A27D	55	0	-	-	-	-
T2A4C	55	0	-	-	-	-
T2A11C	55	0	-	-	-	-
T2A25D	55	0	-	-	-	-
T2A23D	55	0	-	-	-	-
T2A29D	55	0	-	-	-	-
T2A26D	55	0	-	-	-	-
T2A17C	55	0	-	-	-	-
T2A6C	55	0	-	-	-	-
T2A9C	55	0	-	-	-	-
T3A29D	65	0	-	-	-	-
T3A28D	65	0	-	-	-	-
T3A22D	65	0	-	-	-	-
T3A23D	65	0	-	-	-	-
T3A2C	65	0	-	-	-	-
T3A1C	65	0	-	-	-	-
T3A6C	65	0	-	-	-	-
T3A21D	65	0	-	-	-	-
T3A11C	65	0	-	-	-	-
T3A9C	65	0	-	-	-	-
T3A13C	65	0	+++	1,0 (0,0)	< 0,15	50,1±0,03
T4A38DP <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A41DP <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A44DP <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A21DB <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A24DB <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A18DB <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A48DP <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A45DP <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A34CB <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A20DB <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A47DP <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A43DP <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A13DB <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A46DP <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-

S1A3C	40	50	+	2,3 (0,1)	8,71	55,1±0,03
S1A21D	40	50	+++	3,5 (0,8)	180,14	29,2±0,03
S1A1C	40	50	+++	11,3 (0,4)	1294,43	27,3±0,03
S1A39C	40	50	+	1,1 (0,1)	< 0,15	31,7±0,03
S1A13C	40	50	-	-	-	-
S1A10C	40	50	+	5,4 (0,1)	458,71	33,2±0,03
S1A22D	40	50	-	-	-	-
S1A20C	40	50	-	-	-	-
S1A23D	40	50	-	-	-	-
S1A5C	40	50	-	-	-	-
S2A17C	40	10	-	-	-	-
S2A13C	40	10	-	-	-	-
S2A27D	40	10	-	-	-	-
S2A28D	40	10	-	-	-	-
S2A34D	40	10	-	-	-	-
S2A15C	40	10	-	-	-	-
S2A37D	40	10	-	-	-	-
S2A10C	40	10	-	-	-	-
S2A22D	40	10	-	-	-	-

A produção de biossurfactantes foi avaliada por meio dos testes do Colapso da Gota e do Espalhamento de Óleo quando os microrganismos foram cultivados em diferentes temperaturas e diferentes meios de cultura, sob agitação de 200 rpm durante 120 h

<sup>1</sup> Desvio-padrão em parênteses.

<sup>2</sup> - = não houve espalhamento da gota, + = houve pouco espalhamento da gota, +++ = houve espalhamento total da gota.

<sup>3</sup> Cultivados em presença de glicina betaína e prolina a 2 mmol/L.

## 2. Meio mineral 1

Isolado	Temperatura (°C)	Concentração de NaCl (g L <sup>-1</sup> )	Teste do colapso <sup>2</sup>	Diâmetro do halo (cm)	Atividade de biossurfactante (mg L <sup>-1</sup> surfactina equivalente)	Tensão superficial (mN/m)
T1A26C	40	0	-	-	-	-
T1A82D	40	0	-	-	-	-
T1A54C	40	0	-	-	-	-
T1A98D	40	0	-	-	-	-
T1A29C	40	0	-	-	-	-
T1A46C	40	0	-	-	-	-
T1A12C	40	0	-	-	-	-
T1A30C	40	0	-	-	-	-
T1A8C	40	0	-	-	-	-
T1A7C	40	0	-	-	-	-
T1A56C	40	0	-	-	-	-
T1A10C	40	0	-	-	-	-
T1A51C	40	0	-	-	-	-
T1A6C	40	0	-	-	-	-
T1A41C	40	0	-	-	-	-
T1A96D	40	0	-	-	-	-
T1A91D	40	0	-	-	-	-
T1A4C	40	0	-	-	-	-
T1A53C	40	0	-	-	-	-
T1A63D	40	0	-	-	-	-

T1A3C	40	0	-	-	-	-
T1A1C	40	0	-	-	-	-
T1A84D	40	0	-	-	-	-
T1A44C	40	0	-	-	-	-
T1A45C	40	0	-	-	-	-
T1A78D	40	0	-	-	-	-
T1A14C	40	0	-	-	-	-
T1A95D	40	0	-	-	-	-
T1A21C	40	0	-	-	-	-
T1A55C	40	0	-	-	-	-
T1A33C	40	0	-	-	-	-
T1A13C	40	0	-	-	-	-
T1A50C	40	0	-	-	-	-
T1A17C	40	0	-	-	-	-
T1A24C	40	0	-	-	-	-
T1A80D	40	0	-	-	-	-
T1A9C	40	0	-	-	-	-
T1A25C	40	0	-	-	-	-
T1A15C	40	0	-	-	-	-
T1A42C	40	0	-	-	-	-
T1A83D	40	0	-	-	-	-
T1A79D	40	0	-	-	-	-
T1A5C	40	0	-	-	-	-
T1A94D	40	0	-	-	-	-
T1A92D	40	0	-	-	-	-
T1A49C	40	0	-	-	-	-
T1A18C	40	0	-	-	-	-
T1A48C	40	0	-	-	-	-
T1A77D	40	0	-	-	-	-
T1A35D	40	0	-	-	-	-
T1A97D	40	0	-	-	-	-
T1A36C	40	0	-	-	-	-
T1A2C	40	0	-	-	-	-
T1A38C	40	0	-	-	-	-
T1A62D	40	0	-	-	-	-
T2A15C	55	0	-	-	-	-
T2A8C	55	0	-	-	-	-
T2A5C	55	0	-	-	-	-
T2A28D	55	0	-	-	-	-
T2A10C	55	0	-	-	-	-
T2A30D	55	0	-	-	-	-
T2A3C	55	0	-	-	-	-
T2A27D	55	0	-	-	-	-
T2A4C	55	0	-	-	-	-
T2A11C	55	0	-	-	-	-
T2A25D	55	0	-	-	-	-
T2A23D	55	0	-	-	-	-
T2A29D	55	0	-	-	-	-
T2A26D	55	0	-	-	-	-
T2A17C	55	0	-	-	-	-
T2A6C	55	0	-	-	-	-
T2A9C	55	0	-	-	-	-
T3A29D	65	0	-	-	-	-

T3A28D	65	0	-	-	-	-
T3A22D	65	0	-	-	-	-
T3A23D	65	0	-	-	-	-
T3A2C	65	0	-	-	-	-
T3A1C	65	0	-	-	-	-
T3A6C	65	0	-	-	-	-
T3A21D	65	0	-	-	-	-
T3A11C	65	0	-	-	-	-
T3A9C	65	0	-	-	-	-
T3A13C	65	0	-	-	-	-
T4A38DP <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A41DP <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A44DP <sup>3</sup>	70	0	+	2,1 (0,5)	< 0,15	46,1±0,03
T4A21DB <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A24DB <sup>3</sup>	70	0	+	2,8 (0,2)	80,14	47,4±0,03
T4A18DB <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A48DP <sup>3</sup>	70	0	+	1,2 (0,8)	< 0,15	44,9±0,03
T4A45DP <sup>3</sup>	70	0	+	2,7 (0,1)	65,86	46,5±0,02
T4A34CB <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A20DB <sup>3</sup>	70	0	+	0,8 (0,4)	< 0,15	45,2±0,03
T4A47DP <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A43DP <sup>3</sup>	70	0	+	2,5 (0,6)	44,43	50,2±0,03
T4A13DB <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A46DP <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
S1A3C	40	50	-	-	-	-
S1A21D	40	50	-	-	-	-
S1A1C	40	50	-	-	-	-
S1A39C	40	50	-	-	-	-
S1A13C	40	50	-	-	-	-
S1A10C	40	50	-	-	-	-
S1A22D	40	50	-	-	-	-
S1A20C	40	50	-	-	-	-
S1A23D	40	50	-	-	-	-
S1A5C	40	50	-	-	-	-
S2A17C	40	10	-	-	-	-
S2A13C	40	10	-	-	-	-
S2A27D	40	10	-	-	-	-
S2A28D	40	10	-	-	-	-
S2A34D	40	10	-	-	-	-
S2A15C	40	10	-	-	-	-
S2A37D	40	10	-	-	-	-
S2A10C	40	10	-	-	-	-
S2A22D	40	10	-	-	-	-

A produção de biossurfactantes foi avaliada por meio dos testes do Colapso da Gota e do Espalhamento de Óleo quando os microrganismos foram cultivados em diferentes temperaturas e diferentes meios de cultura, sob agitação de 200 rpm durante 120 h

<sup>1</sup> Desvio-padrão em parênteses.

<sup>2</sup> - = não houve espalhamento da gota, + = houve pouco espalhamento da gota, +++ = houve espalhamento total da gota.

<sup>3</sup> Cultivados em presença de glicina betaína e prolina a 2 mmol/L.

### 3. Meio Mineral 2

Isolado	Temperatura (°C)	Concentração de NaCl (g L <sup>-1</sup> )	Teste do colapso <sup>2</sup>	Diâmetro do halo (cm)	Atividade de biossurfactante (mg L <sup>-1</sup> surfactina equivalente)	Tensão superficial (mN/m)
T1A26C	40	0	-	-	-	-
T1A82D	40	0	-	-	-	-
T1A54C	40	0	-	-	-	-
T1A98D	40	0	-	-	-	-
T1A29C	40	0	-	-	-	-
T1A46C	40	0	-	-	-	-
T1A12C	40	0	-	-	-	-
T1A30C	40	0	-	-	-	-
T1A8C	40	0	-	-	-	-
T1A7C	40	0	-	-	-	-
T1A56C	40	0	-	-	-	-
T1A10C	40	0	-	-	-	-
T1A51C	40	0	-	-	-	-
T1A6C	40	0	-	-	-	-
T1A41C	40	0	-	-	-	-
T1A96D	40	0	-	-	-	-
T1A91D	40	0	-	-	-	-
T1A4C	40	0	-	-	-	-
T1A53C	40	0	-	-	-	-
T1A63D	40	0	-	-	-	-
T1A3C	40	0	-	-	-	-
T1A1C	40	0	-	-	-	-
T1A84D	40	0	-	-	-	-
T1A44C	40	0	-	-	-	-
T1A45C	40	0	-	-	-	-
T1A78D	40	0	-	-	-	-
T1A14C	40	0	-	-	-	-
T1A95D	40	0	-	-	-	-
T1A21C	40	0	-	-	-	-
T1A55C	40	0	-	-	-	-
T1A33C	40	0	-	-	-	-
T1A13C	40	0	-	-	-	-
T1A50C	40	0	-	-	-	-
T1A17C	40	0	-	-	-	-
T1A24C	40	0	-	-	-	-
T1A80D	40	0	-	-	-	-
T1A9C	40	0	-	-	-	-
T1A25C	40	0	-	-	-	-
T1A15C	40	0	-	-	-	-
T1A42C	40	0	-	-	-	-
T1A83D	40	0	-	-	-	-
T1A79D	40	0	-	-	-	-
T1A5C	40	0	-	-	-	-
T1A94D	40	0	-	-	-	-
T1A92D	40	0	-	-	-	-
T1A49C	40	0	-	-	-	-

T1A18C	40	0	-	-	-	-
T1A48C	40	0	-	-	-	-
T1A77D	40	0	-	-	-	-
T1A35D	40	0	-	-	-	-
T1A97D	40	0	-	-	-	-
T1A36C	40	0	-	-	-	-
T1A2C	40	0	-	-	-	-
T1A38C	40	0	-	-	-	-
T1A62D	40	0	-	-	-	-
T2A15C	55	0	-	-	-	-
T2A8C	55	0	-	-	-	-
T2A5C	55	0	-	-	-	-
T2A28D	55	0	-	-	-	-
T2A10C	55	0	-	-	-	-
T2A30D	55	0	-	-	-	-
T2A3C	55	0	-	-	-	-
T2A27D	55	0	-	-	-	-
T2A4C	55	0	-	-	-	-
T2A11C	55	0	-	-	-	-
T2A25D	55	0	-	-	-	-
T2A23D	55	0	-	-	-	-
T2A29D	55	0	-	-	-	-
T2A26D	55	0	-	-	-	-
T2A17C	55	0	-	-	-	-
T2A6C	55	0	-	-	-	-
T2A9C	55	0	-	-	-	-
T3A29D	65	0	-	-	-	-
T3A28D	65	0	-	-	-	-
T3A22D	65	0	-	-	-	-
T3A23D	65	0	-	-	-	-
T3A2C	65	0	-	-	-	-
T3A1C	65	0	-	-	-	-
T3A6C	65	0	-	-	-	-
T3A21D	65	0	-	-	-	-
T3A11C	65	0	-	-	-	-
T3A9C	65	0	-	-	-	-
T3A13C	65	0	-	-	-	-
T4A38DP <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A41DP <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A44DP <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A21DB <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A24DB <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A18DB <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A48DP <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A45DP <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A34CB <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A20DB <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A47DP <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A43DP <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A13DB <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
T4A46DP <sup>3</sup>	70	0	-	-	-	-
S1A3C	40	50	+++	1,0 (0,0)	< 0,15	71,9±0,03
S1A21D	40	50	+++	0,9 (0,1)	< 0,15	25,9±0,03

<b>S1A1C</b>	40	50	+++	2,2 (0,5)	< 0,15	28,0±0,03
<b>S1A39C</b>	40	50	+++	1,4 (0,0)	< 0,15	28,9±0,03
<b>S1A13C</b>	40	50	-	-	-	-
<b>S1A10C</b>	40	50	-	-	-	-
<b>S1A22D</b>	40	50	-	-	-	-
<b>S1A20C</b>	40	50	-	-	-	-
<b>S1A23D</b>	40	50	+++	1,6 (0,4)	< 0,15	39,0±0,03
<b>S1A5C</b>	40	50	-	-	-	-
<b>S2A17C</b>	40	10	-	-	-	-
<b>S2A13C</b>	40	10	-	-	-	-
<b>S2A27D</b>	40	10	-	-	-	-
<b>S2A28D</b>	40	10	-	-	-	-
<b>S2A34D</b>	40	10	-	-	-	-
<b>S2A15C</b>	40	10	-	-	-	-
<b>S2A37D</b>	40	10	-	-	-	-
<b>S2A10C</b>	40	10	-	-	-	-
<b>S2A22D</b>	40	10	-	-	-	-

A produção de biossurfactantes foi avaliada por meio dos testes do Colapso da Gota e do Espalhamento de Óleo quando os microrganismos foram cultivados em diferentes temperaturas e diferentes meios de cultura, sob agitação de 200 rpm durante 120 h

<sup>1</sup> Desvio-padrão em parênteses.

<sup>2</sup> - = não houve espalhamento da gota, + = houve pouco espalhamento da gota, +++ = houve espalhamento total da gota.

<sup>3</sup> Cultivados em presença de glicina betaína e prolina a 2 mmol/L.

As maiores concentrações de biossurfactantes foram obtidas a partir dos meios de cultivo inoculados com os isolados T1A63D (1115,9 mg L<sup>-1</sup>), T1A55C (1273,0 mg L<sup>-1</sup> surfactina equivalente) e S1A1C (1294,4 mg L<sup>-1</sup> surfactina equivalente). As concentrações relativas de biossurfactantes dos isolados variaram entre menor que 0,15 (mínimo detectável pelo método) e 1294,4 mg L<sup>-1</sup> surfactina equivalente (Tabela 7). Essas concentrações correspondem a estimativas baseadas nos diâmetros dos halos de espalhamento de óleo das amostras, em comparação com o espalhamento resultante da adição de surfactina comercial (Sigma), seguindo-se a equação  $y = 2,189 + 0,007x$  (Fernandes 2011), em que y é o diâmetro do halo do espalhamento de óleo (cm) e x é a concentração surfactina equivalente (mg L<sup>-1</sup>). Portanto, os valores apresentados correspondem a uma atividade de espalhamento de óleo dos biossurfactantes presentes nas amostras. Essa atividade, em condições-padrão de ensaio, depende fundamentalmente de dois fatores: da concentração de moléculas surfactantes e da atividade interfacial das moléculas. Isso equivale a dizer que duas amostras contendo uma mesma concentração de biossurfactantes podem apresentar atividade (diâmetro) de

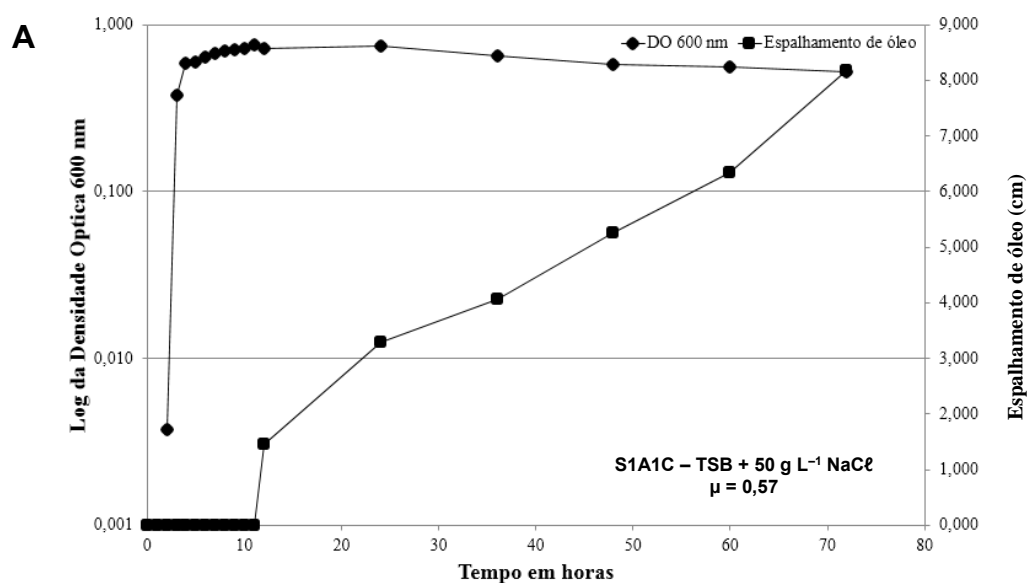
espalhamento de óleo diferente, em razão das diferenças na forma como agem na interface entre o óleo e água (Silva, 2012).

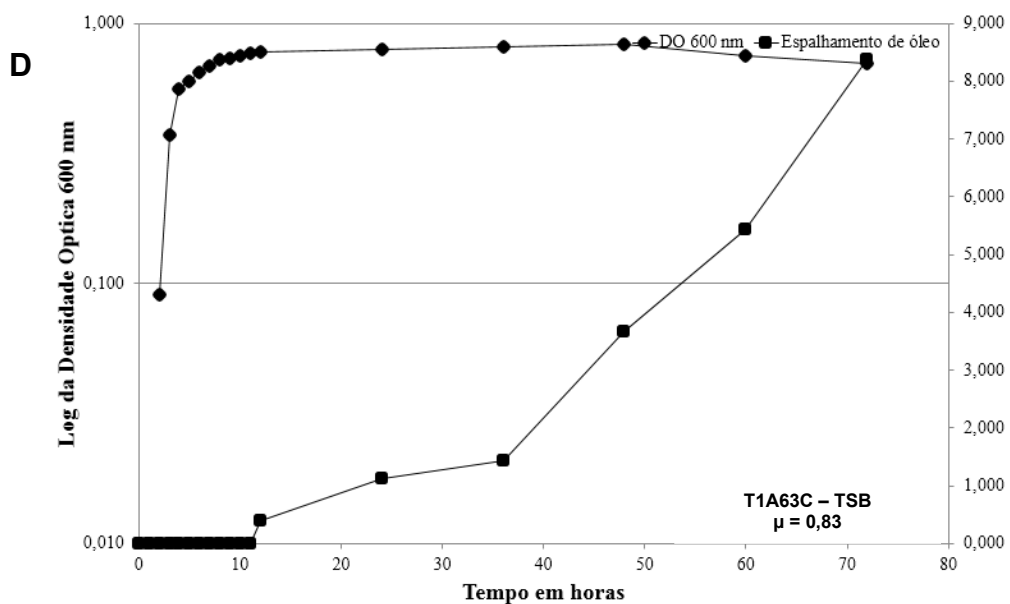
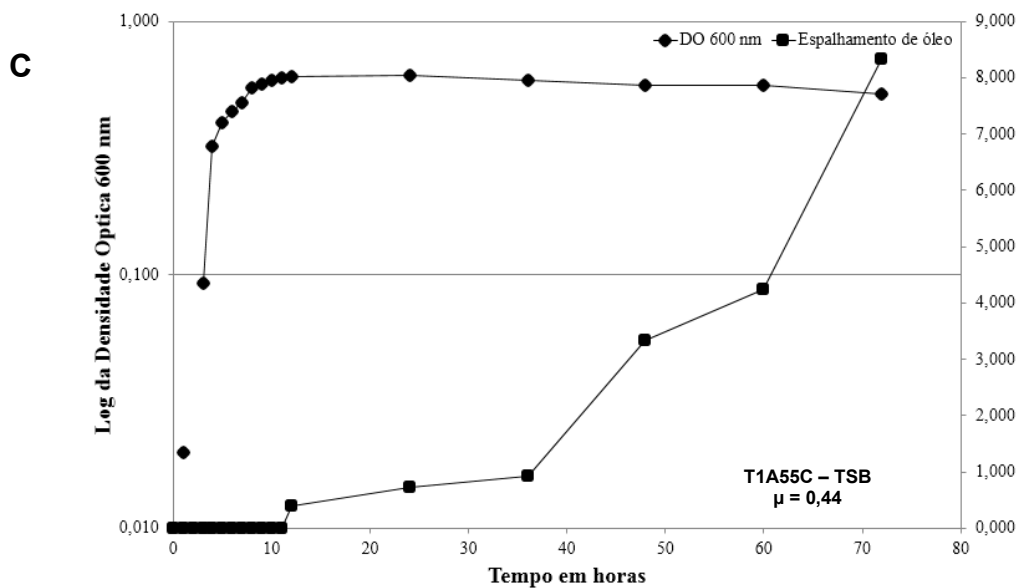
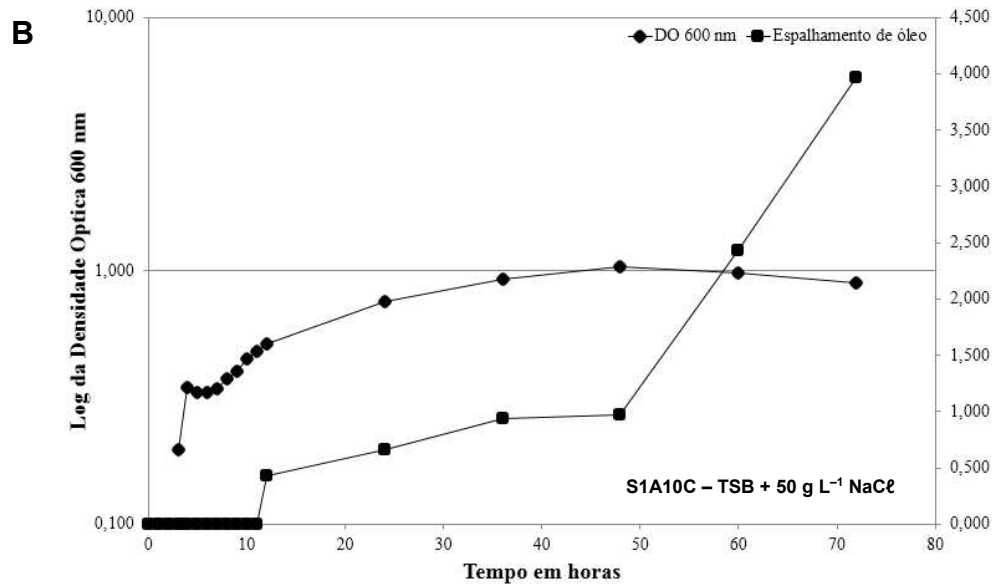
A produção de biossurfactantes pode ser influenciada pelas fontes de carbono e nitrogênio, pela oxigenação e pela temperatura (Fernandes, 2011). Diferentes velocidades de agitação influenciam na produção dos biossurfactantes (Zhu *et al.*, 2012). Portanto, é possível que outras cepas possam ter capacidade de produzir biossurfactantes, mas não foram detectadas nas condições experimentais desse trabalho.

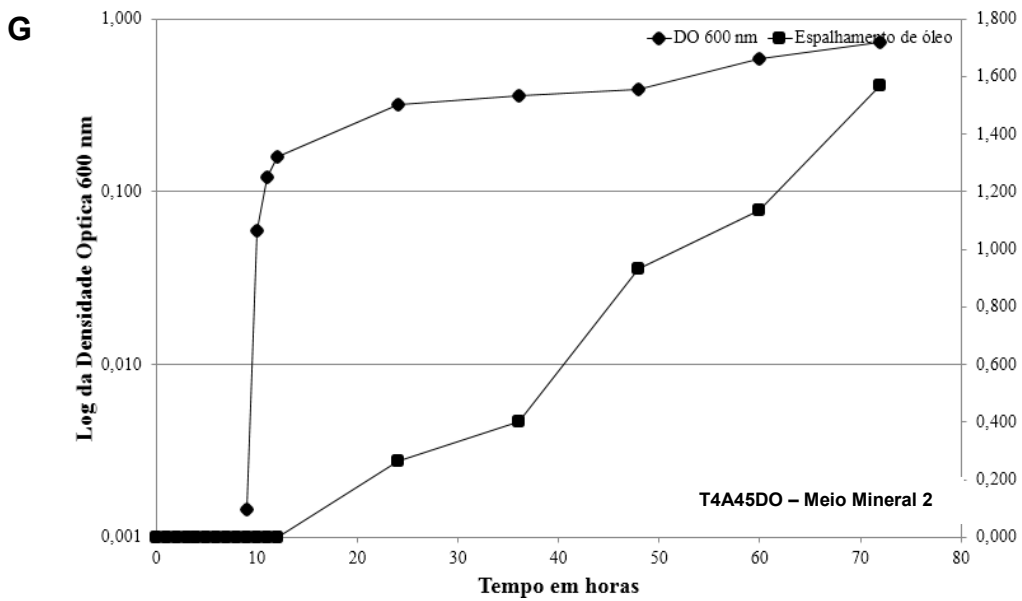
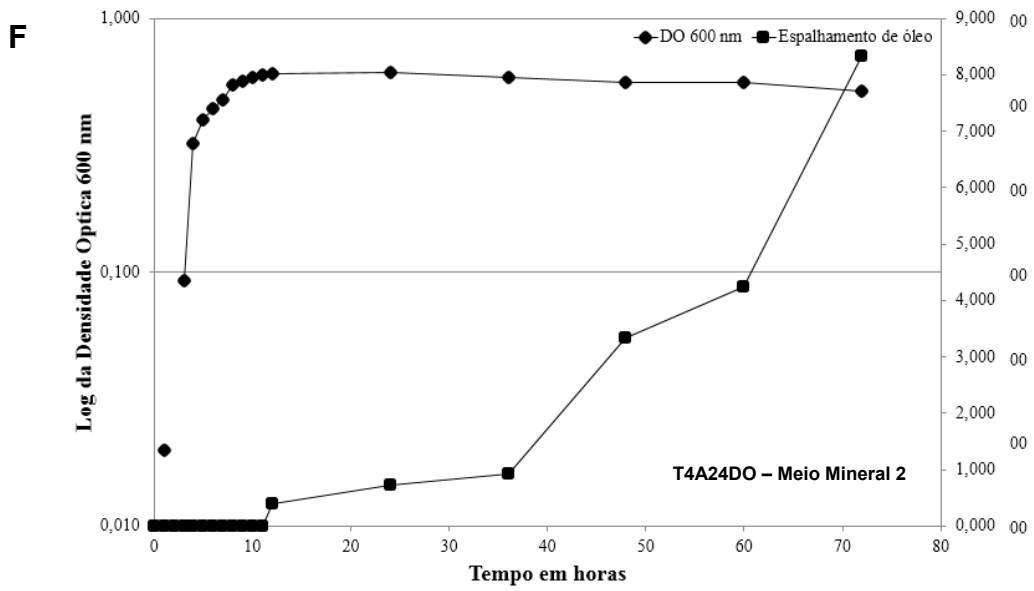
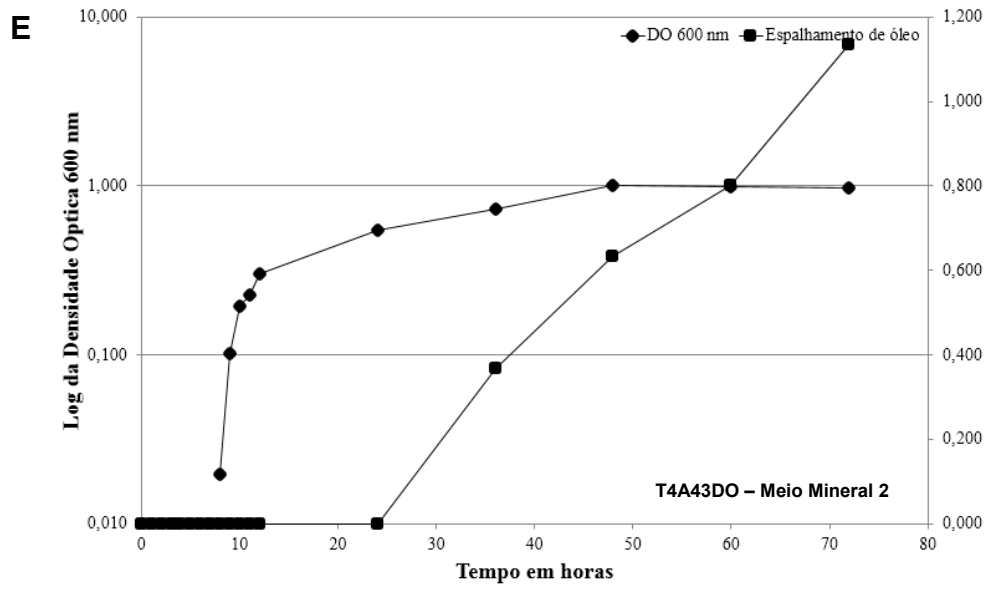
Houve redução da tensão superficial dos meios de cultivo para valores menores que 40mN/m em 16 combinações de isolados e condições de cultivo (meio de cultura, salinidade e temperatura) (Tabela 7). Somente os isolados S1A21D, S1A1C e S1A39C produziram biossurfactantes em dois meios de cultivo (TSB e Meio Mineral 2), na mesma temperatura (40°C) e concentração de NaCl (50 g L<sup>-1</sup>). Nenhum desses isolado reduziu a tensão superficial para abaixo de 40mN/m.

#### 4.5. Cinética de crescimento e produção de biossurfactantes pelos isolados

A figura 1 mostra o crescimento dos sete isolados que apresentaram maior concentração de biossurfactante em meio TSB e meio mineral 1, sob agitação de 200 rpm. A produção de biossurfactantes foi diferenciada entre eles (Figura 2).



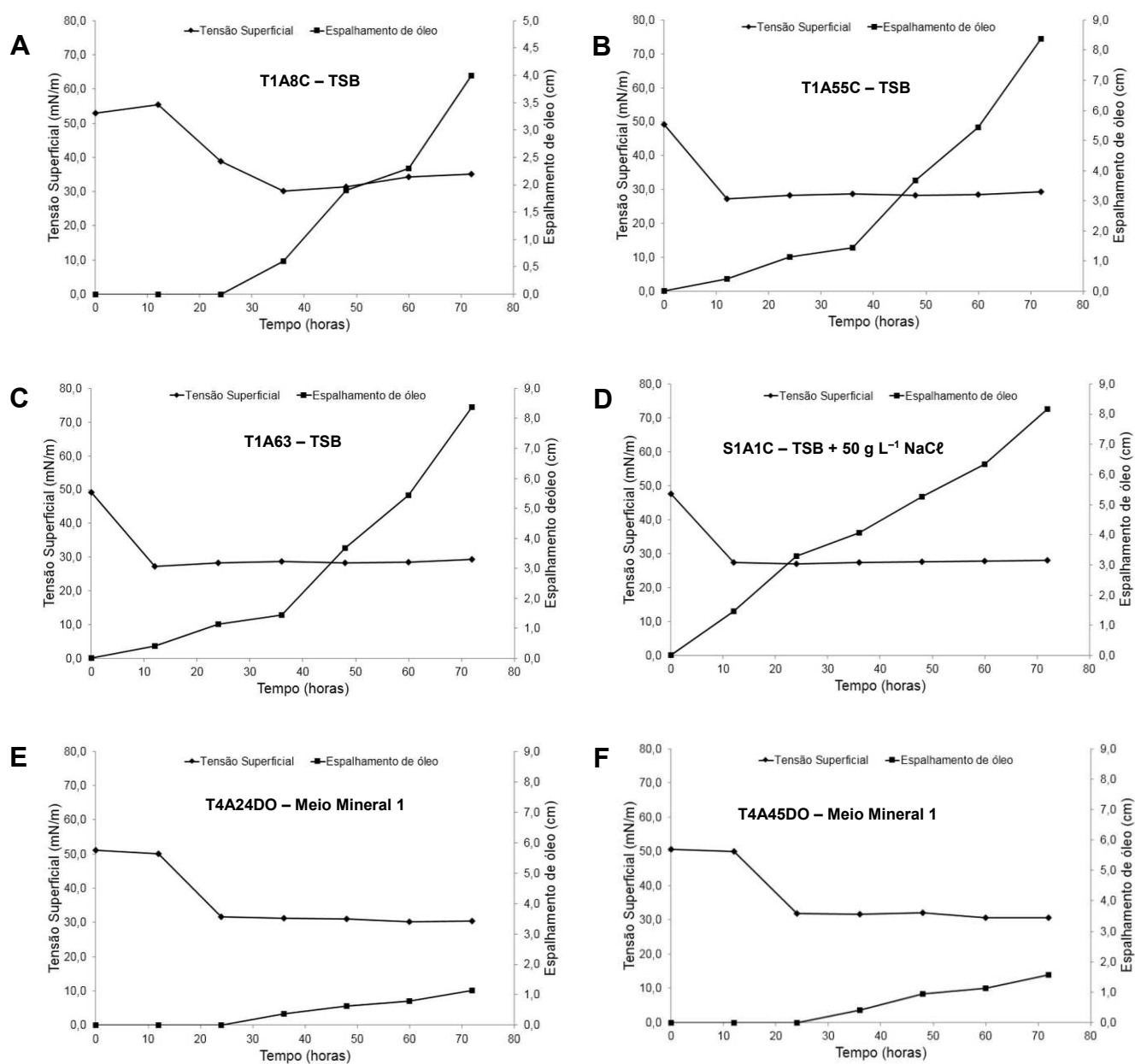




**Figura 1.** Curvas de crescimento dos sete isolados que apresentaram maior produção de biossurfactantes avaliada como surfactina equivalente. Os microrganismos foram cultivados a 40 °C (A, B, C,D) e a 70 °C (E, F, G), sob agitação de 200 rpm durante 72 h. Os valores de pH, ao final do cultivo, foram, respectivamente, 8,2; 8,8; 8,2; 8,8; 8,5; 7,0 e 7,3.

**Tabela 9.** Velocidade específica de crescimento e DO<sub>600</sub> máxima dos quatro isolados que apresentaram maior concentração de biossurfactantes, avaliada como surfactina equivalente

Isolado	Velocidade específica de crescimento ( $\mu h^{-1}$ )	DO <sub>600nm</sub> máxima
T1A8C	0,56	6,25
T1A55C	0,44	5,18
T1A63D	0,83	6,30
S1A1C	0,57	4,50



**Figura 2.** Relação entre a tensão superficial e o halo formado pelo teste do Espalhamento de Óleo. Os microrganismos foram cultivados à 40°C (A, B, C, D) e a 70 °C (E, F), sob agitação de 200 rpm durante 72h. Os valores de pH obtidos, ao final, foram de 8,8; 8,3; 8,8; 8,2; 7,3 e 7,0, respectivamente.

Os isolados T1A8C (Figura 2A), T4A24DO (Figura 2E) e T4A45DO (Figura 2F) levaram aproximadamente 24h para iniciar a produção de biossurfactantes, evidenciada pelo espalhamento de óleo. A produção de biossurfactantes pelos demais isolados foi detectado já a partir de 12 horas (Figuras 2B, 2C e 2D).

As maiores produções de biossurfactantes, expressas como surfactina-equivalente, foram obtidos com os isolados B, C e D (Figura 2).

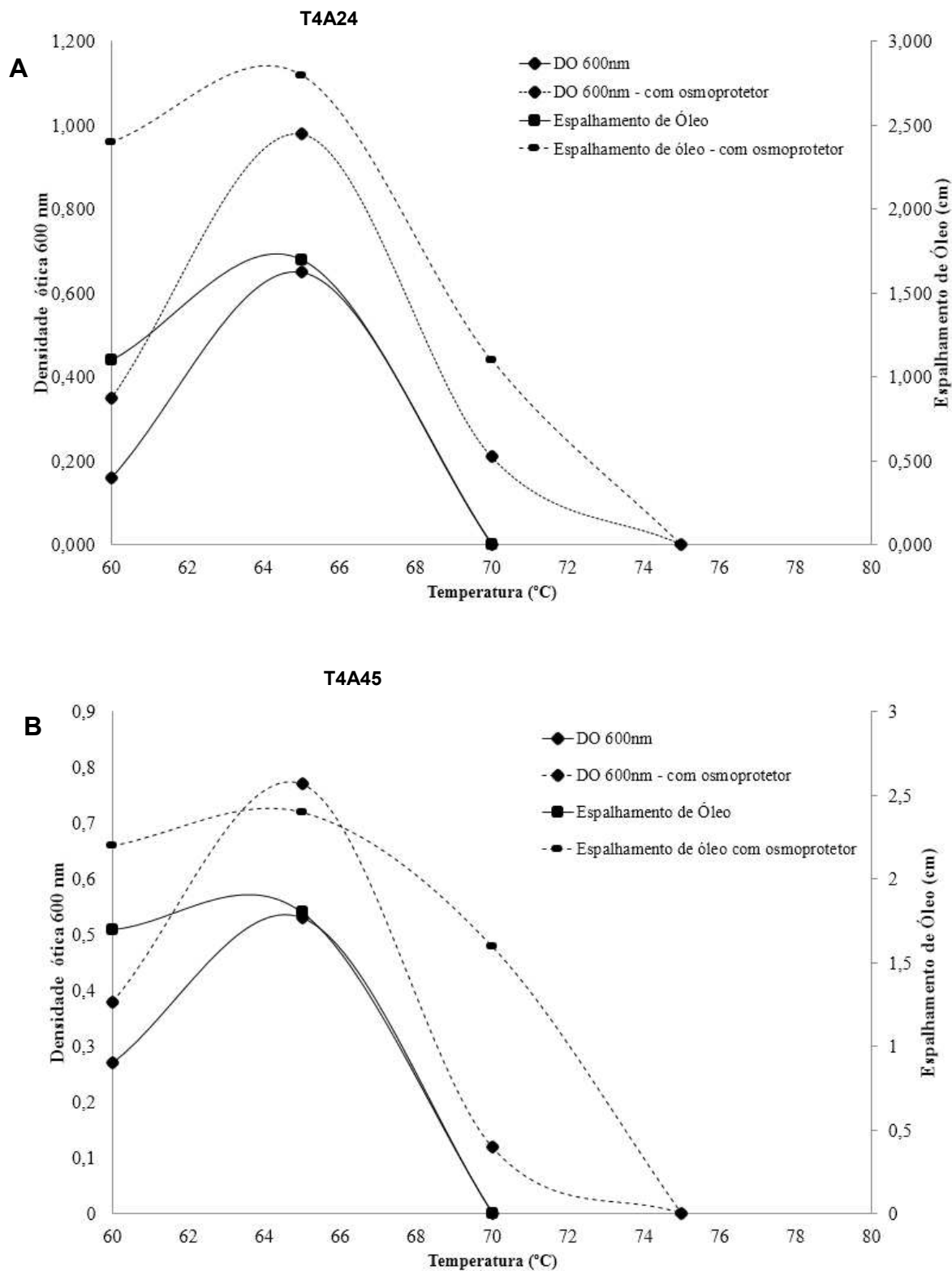
A concentração micelar crítica (CMC) nos meios foi atingida após 12 horas de cultivo dos isolados B, C e D e após 24 horas de cultivo dos isolados E e F (Figura 2). O isolado A produziu biossurfactantes em concentrações equivalentes à CMC somente após 36 horas (Figura 2A).

#### **4.6. Efeito dos osmoprotetores sobre o crescimento de termófilos**

Após a triagem inicial em caldo TSB e nos dois meios minerais, em diferentes temperaturas e concentrações de NaCl, foram selecionados sete isolados para melhor caracterização quanto à produção de biossurfactantes e faixas de tolerância à temperatura.

Foi testado o efeito dos osmoprotetores (glicina betaína e prolina, em concentrações de 2 mmol L<sup>-1</sup>) sobre as faixas de temperatura de crescimento dos isolados e sobre a produção de biossurfactantes em temperatura próxima ao máximo tolerável (70 °C) nos dois isolados que apresentaram maior produção de biossurfactantes avaliada como surfactina equivalente quando crescidos em Meio Mineral 1 (Tabela 7.2).

O uso de osmoprotetores ampliou a faixa de sobrevivência dos microrganismos cultivados (Figura 3), bem como possibilitou o aumento na produção de biossurfactantes. Esse efeito é relatado pela primeira vez na literatura.



**Figura 3.** Curva de crescimento dos isolados (A) T4A24 e TA24DO, (B) T4A45 e T4A45CDO.

DO indicam a presença de osmoprotetores (glicina betaína e prolina). Os microrganismos foram cultivados nas temperaturas de 60 °C, 65 °C, 70 °C e 75 °C, sob agitação de 200 rpm durante 72h em frascos erlenmeyers de 150 mL contendo 50 mL de meio mineral 1.

#### 4.7. Identificação dos isolados

A análise dos perfis de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), utilizando o sistema Sherlock® (MIDI) e a biblioteca de referência ITSA 1.0, permitiu determinar a identidade de 14 dentre os 37 isolados produtores de biossurfactantes obtidos, com base na biblioteca de referência ITSA 1.0 (Tabela 8). Grande parte dos isolados identificados por esse método pertencem a espécies do Filo Firmicutes, gênero *Bacillus*, a saber: *B. badius*, *B. subtilis spizizenii*, *B. ginsengi*, *B. megaterium*, *B. andreesenii*, *B. smithii* e *B. licheniformis*; gênero *Lysinibacillus*: *L. odysseyi*; gênero *Geobacillus*: *G. toebii*; gênero *Piscibacillus*: *P. halophilus* e gênero *Sporosarcina*: *S. luteola*.

Bactérias do filo Firmicutes são comumente isoladas de ambientes do solo, geralmente com estresses térmico e osmótico (Aislabie *et al.*, 2008), condição similar à utilizada neste trabalho. A produção de esporos, alterações na membrana celular, acúmulo de solutos compatíveis e mecanismos diferenciados para reparação de material genético também têm sido relacionados à adaptação a condições de dessecação, altas osmolaridade, temperatura e de pH extremos (Mattimore e Battista, 1996).

**Tabela 10.** Identificação dos isolados produtores de biossurfactantes pelo perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos com base na biblioteca do método ITSA 1 e por sequenciamento e comparação entre as sequências de rDNA 16S no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Isolado	Identificação por MIDI	Identificação por sequenciamento
T1A26C	<i>Bacillus badius</i> (0,751) <sup>1</sup>	<i>Bacillus badius</i> (99%) <sup>2</sup>
T1A82D	<i>Bacillus badius</i> (0,583)	<i>Bacillus badius</i> (99%)
T1A54C	<i>Bacillus badius</i> (0,560)	<i>Bacillus badius</i> (97%)
T1A98D	-	<i>Bacillus andreesenii</i> (98%)
T1A46C	-	<i>Sporosarcina contaminans</i> (99%)
T1A12C	-	<i>Sporosarcina contaminans</i> (98%)
T1A30C	-	<i>Sporosarcina contaminans</i> (96%)
T1A8C	-	<i>Sporosarcina soli</i> (97%)
T1A56C	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (0,224)	<i>Sporosarcina luteola</i> (99%)
T1A6C	<i>Bacillus circulans</i> (0,266)	<i>Bacillus ginsengi</i> (99%)
T1A41C	-	-
T1A96D	-	<i>Lysinibacillus odysseyi</i> (98%)
T1A91D	-	<i>Bhargavaea indica</i> (98%)
T1A4C	-	<i>Bhargavaea ullalensis</i> (99%)
T1A53C	<i>Bacillus subtilis spizizenii</i> (0,689)	<i>Bacillus subtilis</i> (99%)

T1A63D	<i>Bacillus subtilis spizizenii</i> (0,712)	<i>Bacillus subtilis</i> (96%)
T1A3C	-	<i>Sporosarcina contaminans</i> (99%)
T1A1C	-	<i>Sporosarcina soli</i> (98%)
T1A44C	-	-
T1A55C	<i>Bacillus megaterium</i> (0,161)	<i>Bacillus megaterium</i> (99%)
T1A83D	<i>Bacillus licheniformis</i> (0,800)	<i>Bacillus licheniformis</i> (97%)
T1A49C	-	<i>Lysinibacillus odysseyi</i> (99%)
T1A77D	-	<i>Lysinibacillus odysseyi</i> (96%)
T1A97D	-	<i>Sporosarcina luteola</i> (98%)
T3A13C	-	<i>Bacillus smithii</i> (99%)
S1A3C	-	<i>Piscibacillus halophilus</i> (99%)
S1A21D	<i>Bacillus licheniformis</i> (0,749)	<i>Halobacillus kuroshimensis</i> (94%)
S1A1C	<i>Bacillus subtilis spizizenii</i> (0,691)	<i>Bacillus subtilis</i> (93%)
S1A10C	<i>Bacillus licheniformis</i> (0,693)	<i>Bacillus licheniformis</i> (99%)
S1A39C	<i>Bacillus subtilis spizizenii</i> (0,665)	<i>Bacillus subtilis</i> (98%)
T4A44DO	-	<i>Geobacillus toebii</i> (98%)
T4A24DO	-	<i>Geobacillus toebii</i> (99%)
T4A48DO	-	<i>Geobacillus toebii</i> (98%)
T4A45DO	-	<i>Sporosarcina luteola</i> (98%)
T4A20DO	-	<i>Geobacillus toebii</i> (99%)
T4A43DO	-	<i>Geobacillus toebii</i> (99%)
S1A23D	<i>Curtobacterium luteum</i> (0,331)	<i>Curtobacterium luteum</i> (98%)

<sup>1</sup> – Índice de similaridade

<sup>2</sup> – Valor de identidade

Complementar à análise pelo sistema MIDI, os 37 isolados foram identificados com base na sequência parcial do gene rDNA 16S. Foram identificados 34 isolados. As sequências obtidas foram comparadas às pertencentes ao banco de dados no NCBI, com o auxílio da ferramenta BLAST. Os valores de identidade variaram entre 93 e 99 % (Tabela 10). De modo geral, valores de identidade em torno de 97 % são utilizados em estudos de filogenia para conceituação de organismos pertencentes a uma mesma espécie (Al-Batayneh *et al.* 2011).

*Geobacillus* é um novo gênero pertencente à família Bacillaceae. Espécies desse gênero cujos representantes utilizam hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia (Gondim e Paz, 2007) apresentam características interessantes para aplicações biotecnológicas, a exemplo da capacidade de crescerem em altas temperaturas e salinidades. Essas características aumentam o interesse por este microrganismo na produção de biosurfactantes, em condições adversas para os demais microrganismos geralmente descritos na literatura.

O gênero *Bhargavaea* é um membro da família Planococcaceae (classe Bacilli). Ele foi primeiramente relatado em 2009 com a espécie *Bhargavaea cecembensis*, isolada a partir de uma amostra de sedimento em alto-mar recolhida no Oceano Índico. O gênero *Bhargavaea* atualmente compreende três espécies. Este gênero é caracterizado por bactérias não móveis, em forma de bastonete, gram-positiva, não formadoras de endósporos (VERMA *et al.*, 2013).

*Curtobacterium luteum*, embora descrita como uma bactéria psicrotrófica gram-positiva (Kuddus e Ramteke, 2008), foi isolada a 40 °C, com concentração de NaCl de 50 g L<sup>-1</sup>.

Não foram encontradas na literatura informações sobre a produção de biosurfactante por espécies dos gêneros *Bhargavaea*, *Curtobacterium* e *Sporosarcina*.

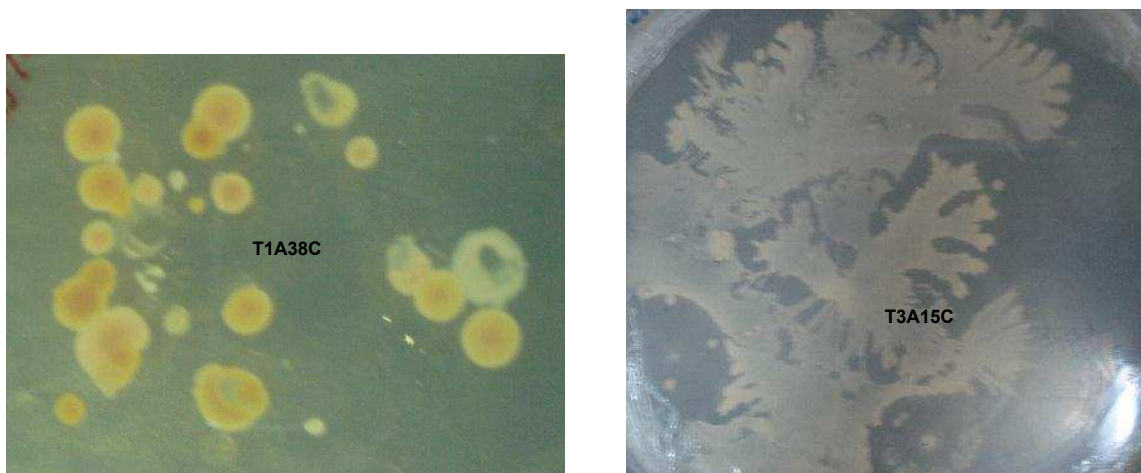
## 5. CONCLUSÕES

A estratégia de enriquecimento da comunidade microbiana de compostos de resíduos sólidos urbano em elevação crescente de temperatura (40-70 °C) e de concentração de NaCl (0 a 170 g L<sup>-1</sup>) mostra ser adequada para o isolamento de bactérias termófilas e halotolerantes. A adição dos osmoprotetores glicina-betaína e prolina ao composto, durante a incubação nas diferentes temperaturas e salinidades, e também ao meio de cultivo, favoreceram o isolamento em condições extremas de temperatura e salinidade. Dentre os 116 isolados obtidos, 37 demonstraram potencial para a produção de biossurfactante. As maiores produções de biossurfactantes foram obtidos em TSB a 40 °C. *Geobacillus toebii* (T4A24DO) e *Sporosarcina luteola* (T4A45DO) produziram biossurfactantes em temperaturas de até 70 °C. A adição de osmoprotetores ao meio de cultivo ampliou a temperatura máxima de crescimento, a concentração de biossurfactantes produzidos e a temperatura máxima de produção de biossurfactantes.

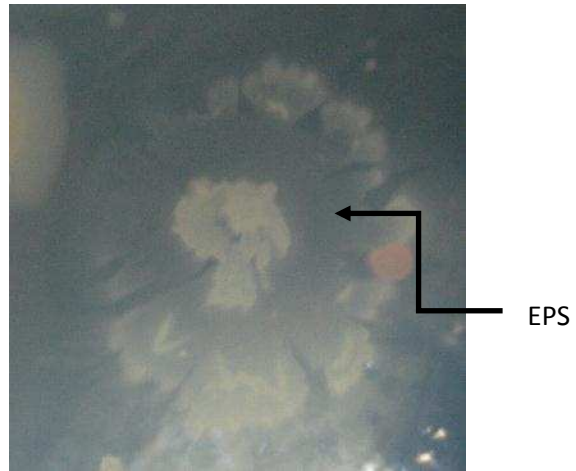
## 6. ANEXOS



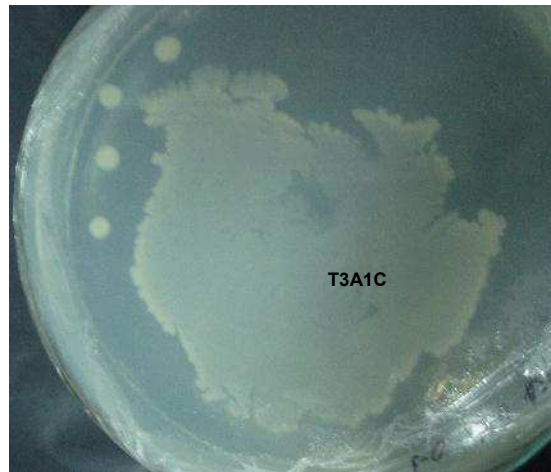
**Figura 4.** Pilha da qual foi retirada a amostra para análise e estudo. Usina de Reciclagem e Compostagem de Lixo do município de Coimbra, Minas Gerais.



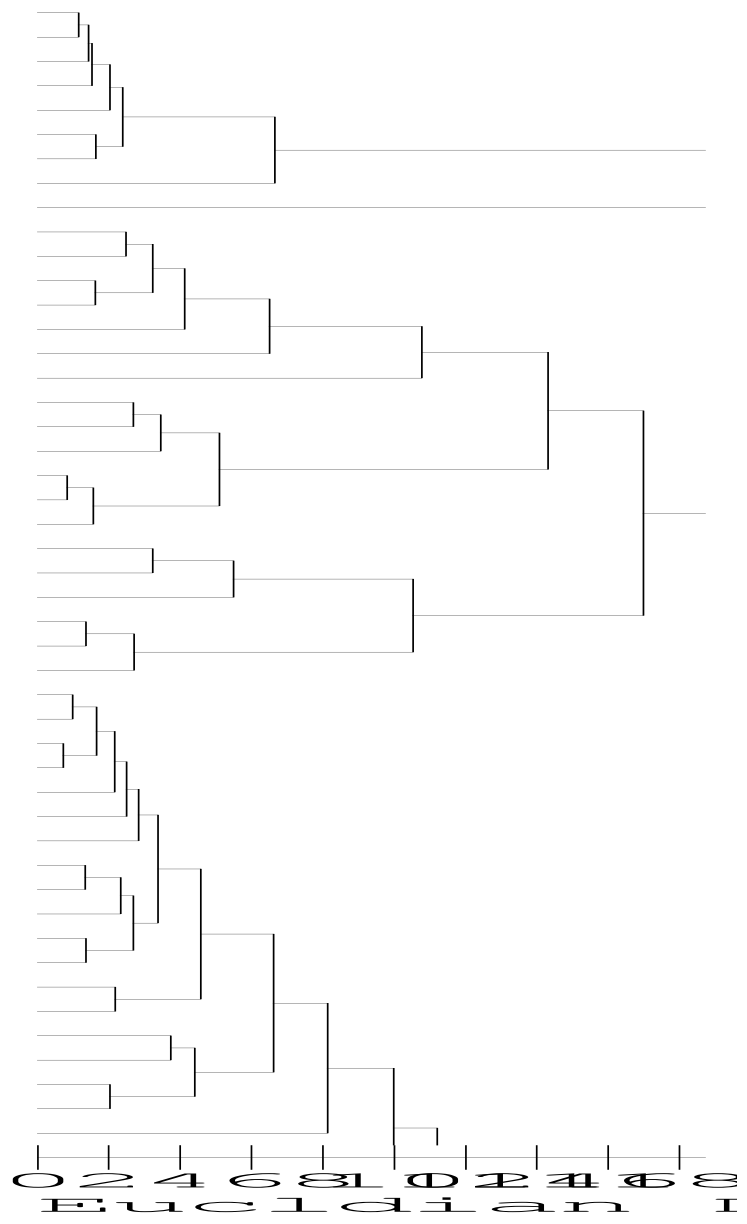
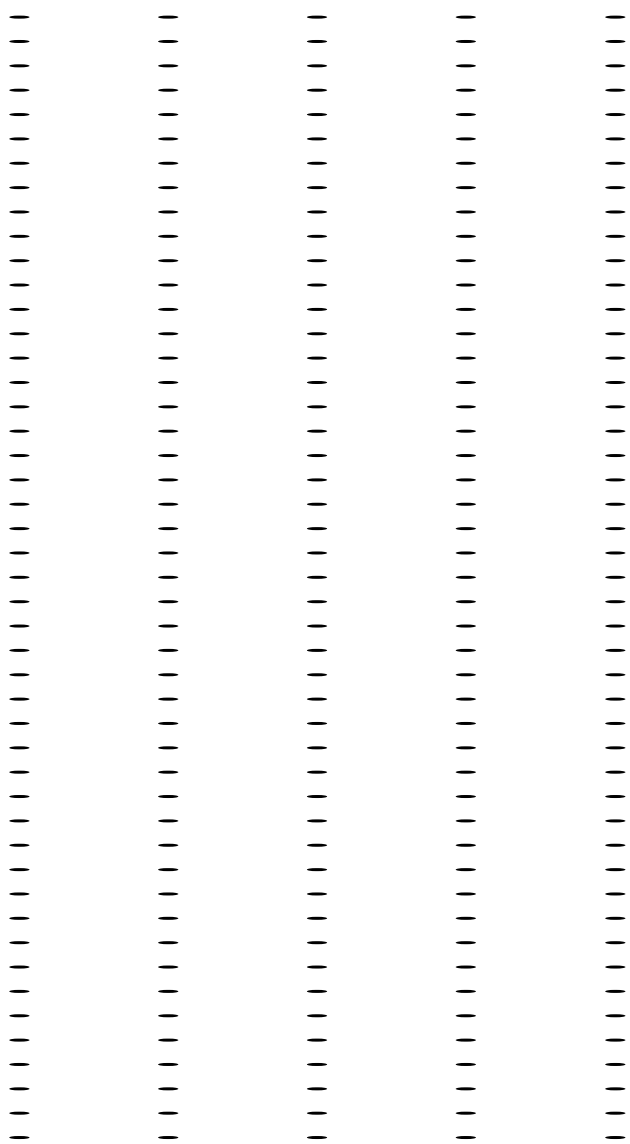
**Figura 5.** Diversidade morfológica das colônias de bactérias termófilas. Imagem à esquerda obtida de crescimento a 40 °C (T1A38C); da direita, a 65 °C (T3A15C).

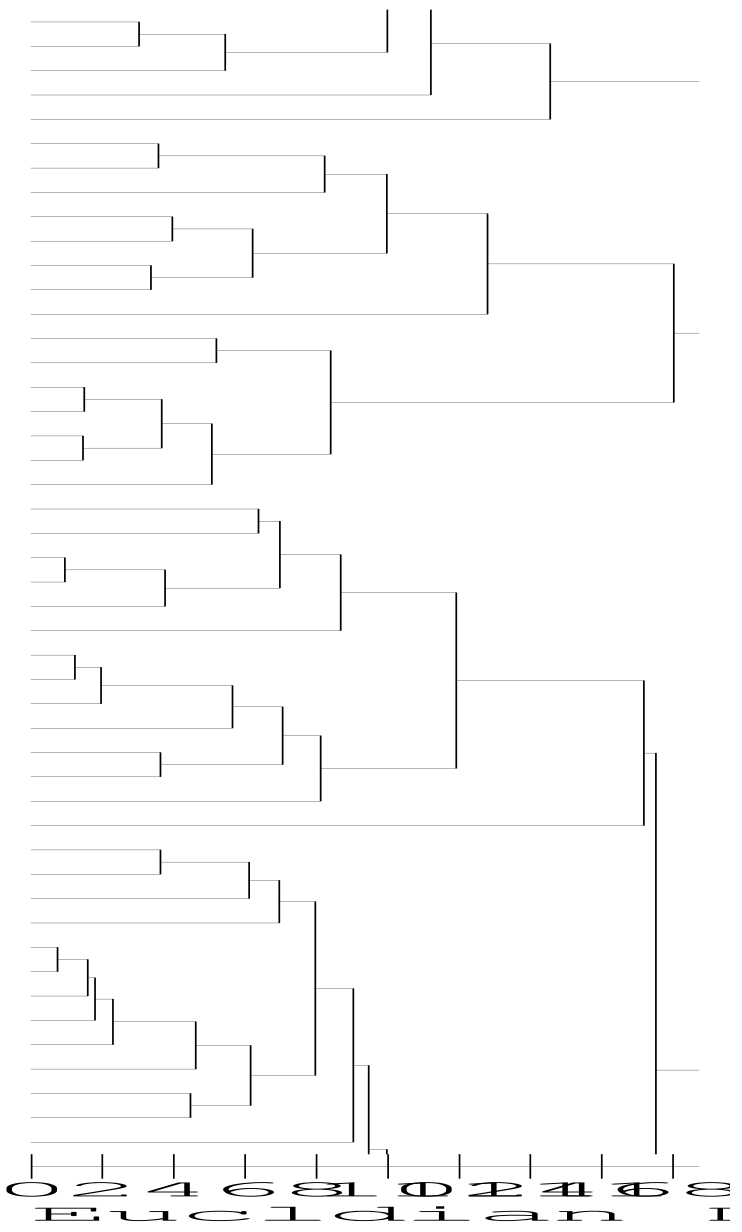
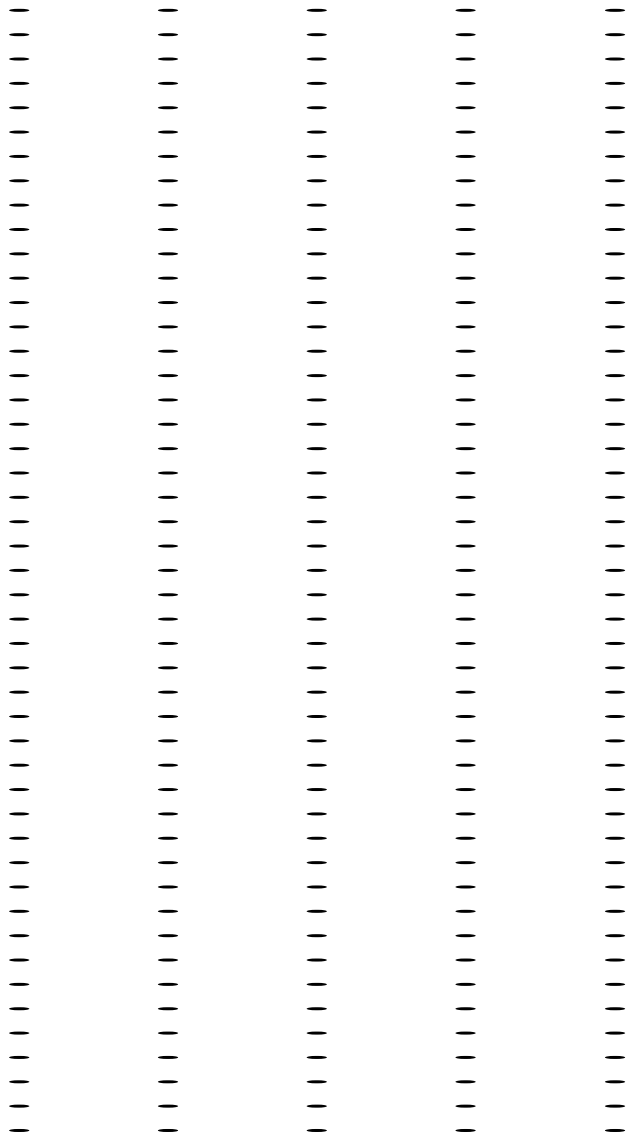


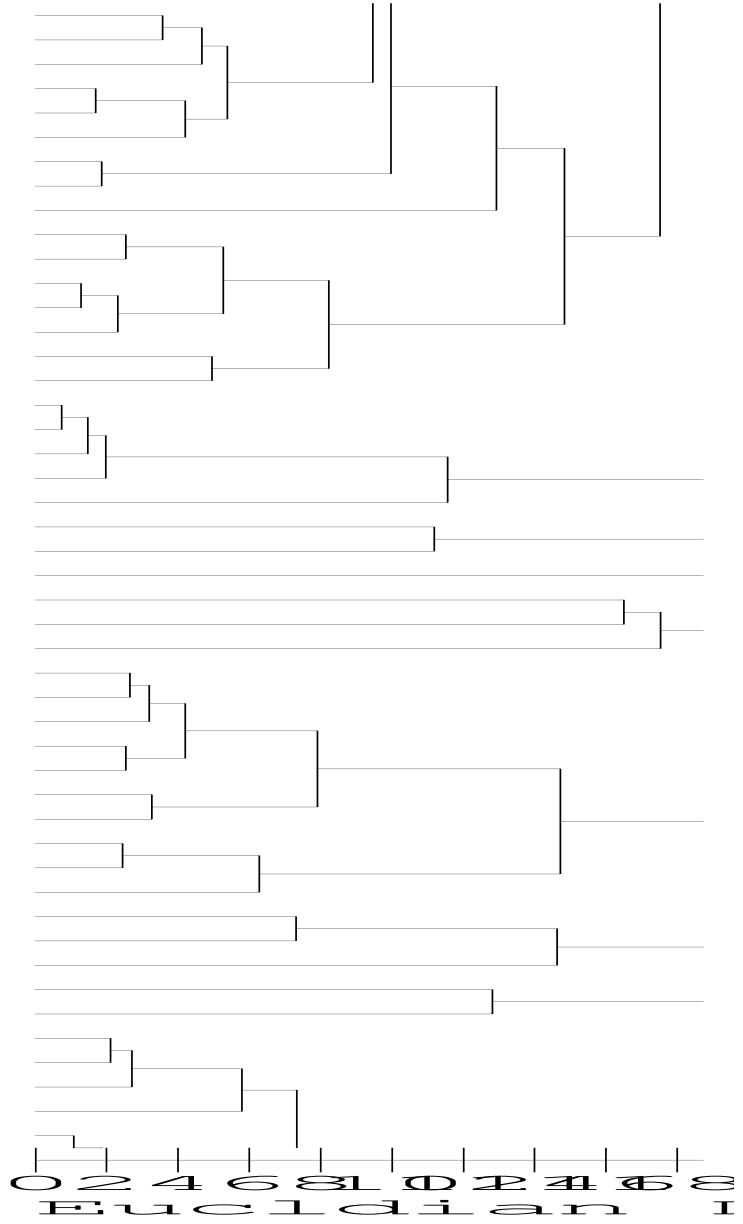
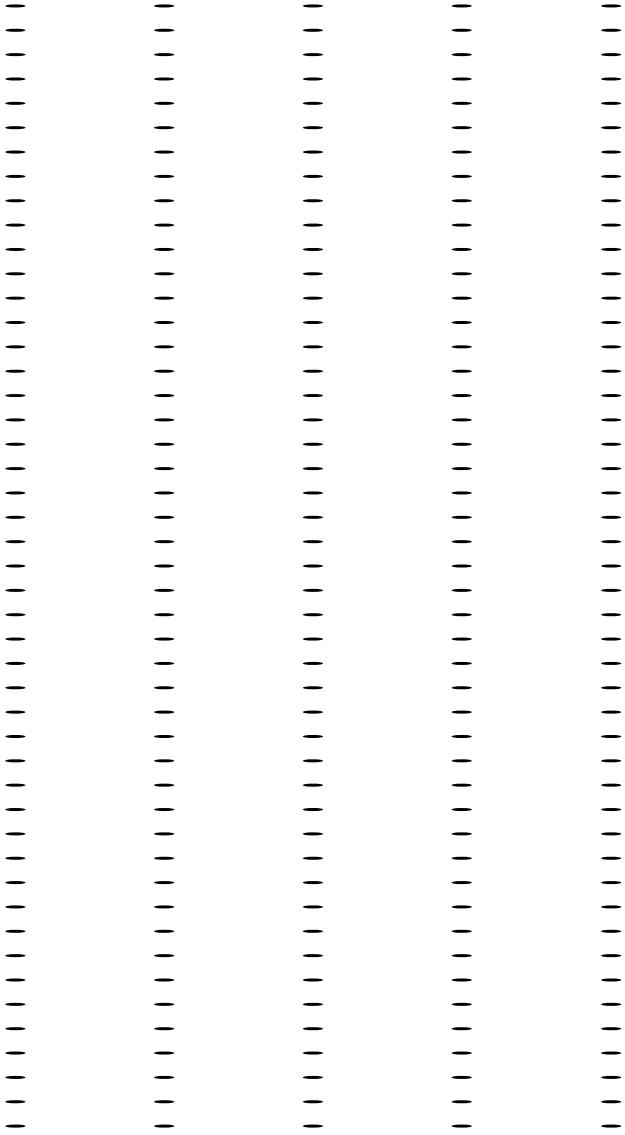
**Figura 6.** Secreção de substância extracelular polimérica (EPS) por bactéria crescendo a 65 °C (T3A15C), apontado pela seta.

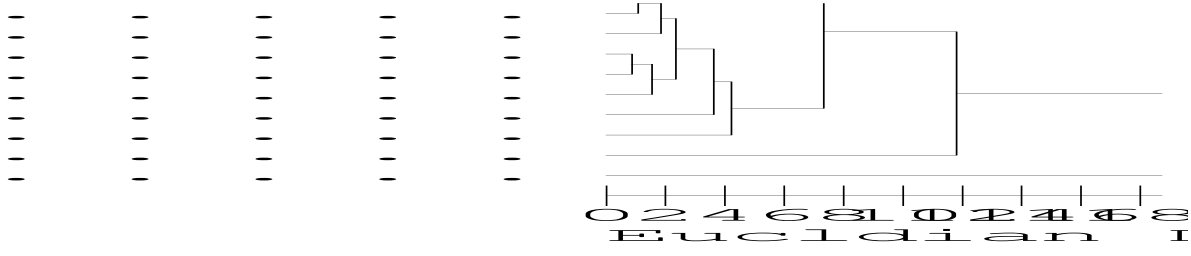


**Figura 7.** Colônia de crescimento rápido, incubada a 65 °C/24 h (T3A1C).









**Figura 8.** Dendrograma construído com base na Distância Euclidiana dos perfis de ácidos graxos dos isolados obtidos de material de compostagem, analisados pelo método ITSA 1.00 (MIDI).

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ARAUJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Química Nova**, Vol. 36, N. 6, p. 848-858, 2013.

BANAT, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. **Bioresource Technology**, Vol.51(1), p.1-12, 1995.

\_\_\_\_\_.Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal–State of the Art. (Review). **Acta Biotechnology**. Vol.15, p.251-267, 1995.

BANAT, I. M.*et al.*Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Vol.7(1), p. 80-88, 1991.

BARBOSA, L. C. A. **Introdução à química orgânica**. 2. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2011.

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

BATISTA, F. M. **Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* com elevada eficiência na mobilização de óleo pesado**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 2008.

BAYLEY, R.M.; MORTON, R.A. Recent developments in the molecular biology of extremely halophilic bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**. Vol. 6, p.151-205, 1978.

BERNARDES, L. **Exoplanetas, Extremófilos e Habitabilidade**. 2013. 208f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Departamento de Astronomia do Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas, Universidade de São Paulo. 2013.

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

BIDONE, F.R.A. **Conceitos Básicos de Resíduos Sólidos**. São Paulo: Edição São Carlos, 1999.

BONDOUR, A.A., MILLER-MAIER, R.M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactante quantitation and triagem of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiology Methods**. Vol.32, p.273-80, 1998.

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

BROWN, A. D. **Microbial water stress physiology: principles and perspectives**. Jhon Wiley& Sons, Ltd.,Chichester, Uniten Kingdom, 1990.

CAMEOTRA S.S.; MAKKAR, R.S. Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. **Pure Applied Chemistry**, Vol.82, n.1, p.97-116, 2010.

CHOW, F. I.; TAN, S. T. Manganese (II) induces cell division and increases in superoxide dismutase and catalase activities in anaging deinococcal culture. **Journal of Bacteriology**. Vol. 172, p. 2029–2035, 1990.

CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M., Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 50, p. 846–850, 1985.

DASSARMA, S.; DASSARMA, P. **Halophiles**: Enciclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group. www.els.net: 1-9, 2001.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, Vol.61, n.1, p.47-64, 1997.

FARAH, M. A. **Petróleo e seus derivados**. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

FERNANDES, P. L. **Biossurfactantes e polímeros de *Bacillus subtilis* R14914 e sua aplicação em recuperação avançada de petróleo**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, 2011.

FITTER, J. A measure of conformational entropy change during thermal protein unfolding using neutron spectroscopy. **Biophysical Journal**, Vol. 84 (6), p.3924-3930, 2003.

FROCK, A. D.; KELLY, R. M. Extreme thermophiles: moving beyond single-enzyme biocatalysis. **Current Opinion in Chemical Engineering**, Vol. 1, p. 363–372, 2012.

GALINSKI, E.A. Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. **Experientia**. Vol.49, p.487-496, 1993.

\_\_\_\_\_. Osmoadaptation in bacteria. **Advances in Microbial Physiology**. Vol.37, p. 273-328, 1995.

GONDIM, A. L.N.; PAZ, M. C. F. **Influência da temperatura, fonte de carbono e de pH na produção de biossurfactantes e biomassa por *Geobacillus stearothermophilus* UCP986**. Universidade Federal de Pernambuco Doutorado em Ciências Biológicas. Recife – PE, 2007.

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

HEIDEMANN, B. R.; SILVA, E. R.; SOARES, M.; BARBOSA, V. M. Compostagem acelerada: análise microbiológica do composto. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**. N.8. p.42-46, 2007.

HOBSON, G. D.; POHL, W. **Modern petroleo technology**. Essex: Applied Science, 1975.

JÖNSSON, B.; LINDMAN, B.; HOLMBERG, K.; KRONBERG, B. In **Surfactants and Polymers in Aqueous Solution**; JÖNSSON, B.; LINDMAN, B.; HOLMBERG, K.; KRONBERG, B., eds.; Wiley: New York, 1998, cap. 1.

KAPPELI, O.; FINNERTY, W. R., Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane grown *Acinetobacter*. **Journal Bacteriology**, Vol. 140, p. 707–712, 1979.

KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K.; **Current Science** Vol. 77, p.116, 1999.

KUDDUS, M; RAMTEKE, P. W. A cold-active extracellular metalloprotease from *Curtobacterium luteum* (MTCC 7529): Enzyme production and characterization. **The Journal of General and Applied Microbiology**. Vol. 54, p.385-392, 2008.

LADENSTEIN, R.; REN, B. Protein disulfides and protein disulfide oxidoreductases in hyperthermophiles. **Federation of European Biochemical Societies Journal.**, Vol. 273(18), p. 4170-418, 2006.

LAKSANALAMAI, P.; ROBB, F.T. Small heat shock proteins from extremophiles. **Extremophiles**, Vol. 8, p. 1-11, 2004.

LANGWORTHY, T.A.; MAYBERRY, W.R.; SMITH, P.F. Long chain glycerol di- and tri-alkyl glycerol triether lipids of *Sulfolobus acidocaldarius*. **J. Bacteriol.** 119:106-116, 1974.

LANYI, J. K. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. **Bacteriol. Rev.** Vol. 38, p. 272-290, 1974.

LIMA, C. J. B.; CONTIERO, J. Use of soybean oil fry waste for economical biosurfactant production by isolated *Pseudomonas aeruginosa* using response surface methodology. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**. Vol. 3 (2), p. 162-171, 2009.

LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. **Nature**, Vol. 362, p. 709-715, 1993.

LLAMAS, I.; AMJRES, H.; MATA, J. A.; QUESADA, E.; BÉJAR, V. The potential biotechnological applications of the exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas almeriensis*. **Molecules**, Vol.17, p. 7103-7120, 2012.

LOPEZ, G. DNA supercoiling and temperature adaptation: a clue to early diversification of life. **J. Mol. Evolution**, Vol. 46, p. 439-452, 1999.

MAIER, R. M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. **Advances in Microbial Physiology**. Vol.52, p. 101-121, 2003.

MARGUET, E., FORTERRE, P. DNA stability at temperatures typical for hyperthermophiles, **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 1681-1686, 1994.

MATHEW, G.M.; SUKUMARAN, R.K.; SINGHANIA, R.R.; PANDEY, A. Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation. **J. Sci. Indus. Res.**, 67, 898-907, 2008.

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

MEZHOUD, N.; ZILI, F.; BOUZIDI, N.; HELAOUI, F.; AMMAR, J.; OUADA, H. B. The effects of temperature and light intensity on growth reproduction and EPS synthesis of a thermophilic strain related to genus *Graesiella*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Disponível em <http://link.springer.com/article/10.1007/s00449-014-1204-7>. Acesso em 14. jul.2014.

MILLER, R. M. Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. **Environmental Health Perspectives**. Vol.103 (1), p. 59-62, 1995.

MINTON, K. W. DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. **Molecular Microbiology**, Vol. 13, p. 9–15 1994.

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

MUTHUSAMY, K.; *et al.* Biosurfactants: Properties, comercial production and application. **Current Science**, Vol. 94, N. 6, 25 march 2008.

NEWCOMB, T. G.; LOEB, L. A. in **DNA Damage and Repair, Vol. 1: DNA Repair in Prokaryotes and Lower Eukaryotes** (eds Nickoloff, J. A. & Hoekstra, M. F.) 65–84 Humana, Totowa, NJ, 1998.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, Vol.25, p.772-776, 2002.

O'CONNOR, C. "Are we alone? Astrobiologist lectures on extraterrestrials." *UWIRE Text* 15 Sept. 2013: 1. **Academic One File**. Web. 22 Oct. 2013.

OREN, A. Intracellular salt concentration soft hean aerobic halophilic eubacteria *Haloanaerobium praevalens* and *Halobacteroides halobius*. **Can. J. Microbiol.** Vol.32, p.4-9, 1986.

OREN, A., HELDAL, M., NORDLAND, S. X-ray microanalysis of intracellular ions in the anaerobic halophilic eubacterium *Haloanaerobium praevalens*. **Can. J. Microbiol.** Vol.43, p. 588-592, 1997.

PARREIRA, A. G. **Produção de biossurfactantes e recuperação de óleo pesado em meios porosos não-consolidados**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, 2009.

PEREIRA NETO, J. T. **On the treatment of municipal refuse and sew ages ludge using aerated static pile composting**– a low cost technology aproach. University of Leeds: Inglaterra, p. 839-845, 1987.

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

ROBERTS, M. F. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. **Biomed Central**, Vol. 1(5), 30 p., 2005

ROTHSCHILD, L.J.; MANCINELLI, R.L. Life in extreme environments. **Nature**, Vol. 409(6823), p.1092-1101, 2001.

SINGH, S.P.; PUROHIT, M.K.; AOYAGI, C.; KITAOKA, M.; HAYASHI, K. Effect of growth temperature, induction and molecular chaperones on the solubilization of over-expressed cellobiose phosphorylase from *Cellvibriogilvus* under *in-vivo* conditions. **Biotechnol. Bioproc. Engin.**, Vol.15(2), p.273-276, 2010

SOUZA, M; MELO, V. M. M.; RODRIGUES, S., SANT'ANA H., B., GONÇALVES, L. R. B. Triagem of biosurfactant-producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source. **Bioprocess Biosyst Eng** Vol. 35, p. 897–906, 2012.

SPEIGHT, J. G. **Handbook of petroleum analysis**. Toronto: John Wiley, 2001.

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

THOMAS, J. E. **Fundamentos da engenharia do petróleo**. Rio de Janeiro: Interciência, 2001.

TULEVA, B.K.; IVANOV, G.R.; CHRISTOVA, N.E. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. **Zeitschrift für Naturforschung**, Vol.57, n.3-4, p.356-360, 2002.

TYRELL, R. M. in **Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants**. Ed. Sies, H. Academic, London, p. 57–83, 1991.

VARGAS, C.; ARGANDOÑA, M.; REINA-BUENO, M., RODRÍGUEZ-MOYA, J.; FERNÁNDEZ-AUNIÓN, C.; NIETO, J. Unravelling the adaptation responses to osmotic and temperature stress in *Chromohalobacter salexigens*, a bacterium with broad salinity tolerance. **BioMed Central (Saline Systems)**, Vol. 4, p.1-9, 2008.

VENKATESWARAN, A. *et al.* Physiologic determinants of radiation resistance in *Deinococcus radiodurans*. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol.66, p.2620–2626, 2000.

VERMA, P., SEONG, C.N., PANDEY, P.K., BHONDE, R.R., SPROER, C., ROHDE, M., & SHOUCHE, Y.S. *Bhargavaea indica* sp. nov., a member of the phylum *Firmicutes*, isolated from Arabian Sea sediment. **Journal of Microbiology**. Vol. 51, p.36-42, 2013.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Vol.65(1), p.1-43, 2001.

WALTER, V.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. **Biosurfactants**. Alemanha: Landes Bioscience, 2010.

WATERS, J. **Recent Developments in the Analysis of Surfactants**; Porter, M. R., ed.; Crown House: UK, 1991, Cap. 6.

WETLER-TONINI, R. M.; REZENDE, C.E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e Biorremediação de Compostos do Petróleo por Bactérias: Revisão. **Oecologia Australis**. Vol.14(4), p.1010-1020, 2010.

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

ZOSIM, Z., GUNTICK, D. L.; ROSENBERG, E., Properties of hydrocarbonin water emulsion. **Biotechnology and Bioengineering**, Vol.24, p.281–292, 1982.

ZUCCONI F & BERTOLDI M. Composts specifications for the production and characterization of composts from municipal solid waste. In **Compost: production, quality and use**. London: eds. Elsevier Applied Science, 1987.