

**PÉRICLES LEONARDO FERNANDES**

**PRODUÇÃO DE BIODISSURFACTANTES POR *Bacillus* spp. EM  
CONDIÇÃO ANAERÓBIA**

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  
2007**

**PÉRICLES LEONARDO FERNANDES**

**PRODUÇÃO DE BISSURFACTANTES POR *Bacillus* spp. EM  
CONDIÇÃO ANAERÓBIA**

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: 10 de agosto de 2007.**

---

**Prof. Arnaldo Chaer Borges**  
(Co-orientador)

---

**Prof. Antônio Galvão do Nascimento**

---

**Profa. Célia Alencar de Moraes**

---

**Prof. Maurício Dutra Costa**

---

**Prof. Marcos Rogério Tótola**  
(Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me iluminar e guiar cada momento da minha vida.

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 meu orientador, Professor Marcos Rogério Tótola, pelos ensinamentos transmitidos, pelo incentivo e apoio na realização do meu trabalho e principalmente pela confiança em mim depositada.

Aos professores Arnaldo Chaer Borges, Maurício Dutra Costa, Hilário Cuquetto Mantovani e Antônio Galvão do Nascimento, pelo apoio e ajuda em todos os momentos.

A todos os demais professores e servidores do Departamento de Microbiologia, que ajudaram direta ou indiretamente na conclusão dos meus trabalhos.

A todos os colegas de laboratório, por serem cúmplices do meu sucesso.

Aos meus pais Jair A. Fernandes e Maria da Conceição S. S. Fernandes e irmãos Vítor H. Fernandes e Érika C. Fernandes, por todo o amor e apoio incondicional.

À minha namorada Patrícia B. Nobre, por todo amor e compreensão, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus primos Flávio B. Fernandes e Cristiano Willer, por todos os bons momentos vividos.

## **BIOGRAFIA**

PÉRICLES LEONARDO FERNANDES, filho de Jair Augusto Fernandes e Maria da Conceição Soares da Silva Fernandes, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, no dia 09 de agosto de 1982.

Em janeiro de 2005, diplomou-se em Biologia pela Universidade Estadual de Montes Claros.

Em agosto de 2005 iniciou o programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, na área de Microbiologia Ambiental.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. Recuperação melhorada de petróleo .....	4
2.1.2. Recuperação de petróleo melhorada por microrganismos .....	5
2.2. Metabolismo anaeróbio em bactérias do gênero <i>Bacillus</i> .....	6
2.3. Crescimento anaeróbio e produção de biossurfactantes por <i>Bacillus</i> spp.....	7
2.4. Fatores que afetam a produção de biossurfactantes .....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	10
3.1. Isolados bacterianos .....	10
3.2. Crescimento anaeróbio dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. em meio MM reduzido....	10
3.3. Efeito de diferentes concentrações de ditiotreitól no crescimento dos isolados e na produção de biossurfactantes.....	12
3.4. Influência das fontes de carbono e nitrogênio no crescimento dos isolados e na produção de biossurfactantes. ....	14
3.5. Leitura das tensões interfacias ar-líquido e estimação da diluição micelar crítica (DMC) das culturas .....	15
3.6. Avaliação do índice de emulsificação inicial (EI) e da estabilidade das emulsões (E24) das culturas.....	15
3.7. Análise dos produtos do metabolismo anaeróbio dos isolados.....	16
3.8. Análise Estatística .....	16

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	17
4.1. Crescimento anaeróbio dos isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	17
4.2. Efeito de diferentes concentrações de ditiotreitol no crescimento anaeróbio e produção de biossurfactantes pelos isolados de <i>Bacillus</i> spp. ....	23
4.3. Influência das fontes de carbono e de nitrogênio no crescimento dos isolados e na produção de biossurfactantes .....	35
5. CONCLUSÕES .....	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
ANEXO 1 .....	56
Análise dos produtos do metabolismo anaeróbio dos isolados por HPLC .....	56
ANEXO 2.....	69
Análise Estatística .....	(disponível somente no exemplar da Biblioteca Central da UFV)

## RESUMO

FERNANDES, Péricles Leonardo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2007. **Produção de biossurfactantes por *Bacillus* spp. em condição anaeróbia.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Co-orientadores: Arnaldo Chaer Borges e Hilário Cuqueto Mantovani.

O presente trabalho objetivou determinar as condições nutricionais e de potencial redox que estimulem o crescimento e a produção de biossurfactantes por três isolados do gênero *Bacillus*. Foram utilizados três isolados pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) que possuíam características desejáveis para sua aplicação na recuperação avançada de petróleo, incluindo a capacidade de produzirem biossurfactantes. Dos três isolados, somente o isolado LBBMA111A foi capaz de crescer em meio mineral reduzido com  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de ditiotreitol sem a adição de qualquer fator de crescimento. Os isolados LBBMA155 e LBBMA283 necessitam da adição de DNA ao meio de cultura para apresentarem crescimento vigoroso em baixos potenciais redox. Porém, esse comportamento pode ser alterado de acordo com as condições fisiológicas das bactérias. O potencial redox demonstrou exercer influência sobre o crescimento de todos os isolados, mas em intensidades diferentes. A produção de biossurfactantes também demonstrou ser influenciada pelo potencial redox do meio de cultura onde as bactérias são crescidas. Foram observados indícios de alterações nas moléculas dos biossurfactantes produzidos pelos isolados dependendo da condição redox em que estas foram produzidas. A fonte de carbono e a de nitrogênio adicionadas ao meio de cultura influenciaram o crescimento dos isolados. Fontes de carbono como amido e piruvato demonstraram não ser capazes de sustentar o crescimento dos isolados de *Bacillus* em condição anaeróbia. Tanto a fonte de carbono quanto a fonte de nitrogênio influenciaram de maneira significativa a produção de biossurfactantes pelas bactérias. Apesar dos isolados não apresentarem o mesmo comportamento mediante diferentes fontes de nitrogênio, a proteose peptona demonstrou ser a melhor fonte de nitrogênio tanto para o crescimento quanto para a produção de biossurfactantes pelas bactérias.

Com relação à fonte de carbono, a sacarose proporcionou o melhor crescimento de todos os isolados; porém, para os isolados LBBMA111A e LBBMA283, os melhores dados de produção de biossurfactantes foram obtidos com o cultivo em meio com glicose. Variações nas fontes de carbono e nitrogênio também parecem influenciar a estrutura das moléculas de biossurfactantes produzidos pelas bactérias. Todos os isolados podem ser potencialmente aplicáveis na recuperação avançada de petróleo baseada na produção de biossurfactantes “in situ”; porém, mais estudos devem ser conduzidos para se determinar em quais condições estes poderão atuar.



## ABSTRACT

FERNADES, Péricles Leonardo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2007.  
**Anaerobic production of biosurfactants by *Bacillus* spp.** Adviser: Marcos Rogério Tótola. Co-Advisers: Arnaldo Chaer Borges and Hilário Cuqueto Mantovani.

The objective of the present study was to determine the nutritional and redox conditions that promote the growth and biosurfactant production by *Bacillus* spp.. Three strains belonging to the culture collection of the Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA), previously evaluated for their potential for application in Microbial Enhanced Oil Recovery, including biosurfactant production, were used in the study. Among the three strains, only LBBMA111A was able to grow in mineral medium reduced with 0,5 mmol L<sup>-1</sup> of dithiothreitol in the absence of any growth factor. Strains LBBMA155 and LBBMA283 required supplementation of the growth medium with DNA at low redox potential. However, this behavior can be modified according to the physiological state of the cells. The redox potential was shown to affect the growth patter of all strains, but in different intensities. In addition, the redox potential of the growth media also affected the yield and activity of biosurfactants produced by all strains. The growth of the strains was affected by the carbon and nitrogen sources of the media. The three strains were not able to growth when starch or pyruvate were used as carbon source. Either the carbon source or the nitrogen source of the media affected the production of biosurfactants. The greatest growth and biosurfactant production was observed when proteose peptone was used as the nitrogen source. The greatest growth was obtained when sucrose was the carbon source; however, for strains LBBMA111A and LBBMA283, glucose provided the greatest reduction of the interfacial tension. Variations in carbon and nitrogen sources appear to affect the structure of the biosurfactants produced. It is concluded that the three strains *Bacillus* are potential candidates for Microbial enhanced oil recovery (MEOR) based on the production of biosurfactants in situ; nevertheless, more studies must be conduct to evaluate the range of physical-chemical conditions for their successful application.

## 1. INTRODUÇÃO

O petróleo é considerado atualmente uma fonte de energia indispensável aos processos industriais e ao crescimento econômico das nações. No entanto, a distribuição das jazidas é desuniforme, sendo que apenas nove países do Oriente Médio respondem por cerca de 62% de todas as reservas globais de petróleo (BP, 2006).

O Brasil detém cerca de 1% das reservas mundiais e apresentou um avanço significativo na produção de petróleo bruto. Em uma década (1995 a 2005), o país elevou a produção de 718 mil para 1,718 milhões de barris de petróleo/dia, o que corresponde a um aumento de 139,3%. Porém, em países mais industrializados, como os Estados Unidos, o cenário já não é o mesmo. O país detém 2,4% das reservas mundiais de petróleo e a produção de óleo vem sofrendo decréscimos consideráveis, de 8,322 para 6,830 milhões de barris /dia, no período de 1995 a 2005, o que representa uma queda de 17,92%. No mesmo período, as reservas americanas comprovadas sofreram queda de apenas 1,68%, caindo de 29,8 para 29,3 bilhões de barris (BP, 2006). Esse fato tem sido interpretado como o resultado de uma possível redução na extração de óleo, dirigida pela baixa eficiência das técnicas adotadas até o presente momento, ou ainda como parte de uma política de conservação das reservas próprias para uso futuro.

As tecnologias atuais de exploração de petróleo são, em sua maior parte, baseadas em métodos denominados de recuperação primária e secundária de óleo. A recuperação primária corresponde aos métodos dependentes do fluxo natural do óleo por diferença de pressão entre as partes interna e externa do reservatório. Embora seja

quase sempre o primeiro método adotado, sua implementação depende das características de cada reservatório, e se torna inviável a partir do momento em que a pressão interna atinge um valor limite em que o fluxo de óleo é interrompido. Quando isso ocorre, são adotados os métodos de recuperação secundária, que consistem na injeção de gás ou água dentro do reservatório com o objetivo de manter a pressão interna e impulsionar o óleo para fora (Ollivier e Magot, 2005). O principal ponto negativo atribuído a essas tecnologias é seu baixo rendimento em determinados casos. Em geral, elas possibilitam a mobilização de apenas 30 a 50% do óleo contido nos reservatórios. Nos Estados Unidos, estima-se que 300 bilhões de barris ainda permaneçam nos reservatórios após a extração convencional de petróleo (Lundquist *et al.*, 2001).

Desta forma, novas tecnologias têm sido desenvolvidas com o objetivo de adiar ou reduzir o declínio na produção de petróleo e, ao mesmo tempo, aumentar as reservas exploráveis. Essas tecnologias incluem a utilização de técnicas mais sofisticadas, denominadas técnicas de recuperação melhorada de petróleo (enhanced oil recovery – EOR). Dentre as técnicas de EOR, aquelas baseadas na utilização de microrganismos (MEOR – Microbial enhanced oil recovery) têm demonstrado ser muito promissoras para a implementação em larga escala. Os processos microbianos apresentam vantagens, como o fato de não utilizarem grande quantidade de energia, como os métodos térmicos, e de não dependerem do preço do óleo cru, como alguns métodos químicos. Além disso, vários produtos microbianos de interesse podem ser produzidos a partir de fontes renováveis e de baixo custo (Fox e Bala, 2000; Maneerat, 2005; Nitschke *et al.*, 2005; Mukherjee *et al.*, 2006; Nitschke e Pastore, 2006). Resultados de experimentos de campo demonstraram que é possível produzir-se maior quantidade de petróleo com um incremento de apenas \$3,00 por barril (Brown *et al.*, 2002; Strappa *et al.*, 2004), indicando que os métodos baseados em MEOR podem ser considerados economicamente viáveis.

Dentre as várias estratégias existentes para a implementação da MEOR, a produção *in situ* de biossurfactantes por bactérias do gênero *Bacillus* tem sido apresentada como uma das mais promissoras (Youssef *et al.*, 2006; Soudmand-asli *et al.*, 2007). O sucesso da produção *in situ* de biossurfactantes está vinculado à habilidade das bactérias em crescer e produzir biossurfactantes sob as severas condições ambientais apresentadas pelos reservatórios de óleo, como alta temperatura, pressão e salinidade,

além de condições de baixa ou nenhuma pressão de oxigênio (Cameotra e Makkar, 1998).

Desta forma, o presente trabalho objetivou determinar quais condições nutricionais e de potencial redox possibilitam o crescimento e a produção de biossurfactantes por três isolados do gênero *Bacillus*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Recuperação melhorada de petróleo

A recuperação melhorada de petróleo (EOR – *Enhanced Oil Recovery*) é governada por mecanismos que aumentam a movimentação e vazão de óleo no reservatório, aumentando a produção. Esses mecanismos são baseados em métodos térmicos, químicos, de miscibilidade e microbiológicos (Ollivier e Magot, 2005).

Os métodos térmicos estão entre os métodos de EOR mais utilizados em todo o mundo. Esses métodos têm como princípio a redução da viscosidade do óleo, obtida pelo aumento de sua temperatura por meio da injeção de vapor ou combustão interna controlada no reservatório. Os métodos químicos baseiam-se na injeção de polímeros, surfactantes ou agentes alcalinos. A injeção de polímeros permite o aumento da viscosidade da água; já os surfactantes e agentes alcalinos permitem a redução das forças capilares e da tensão interfacial óleo-água, aumentando a mobilização do óleo. Métodos de miscibilidade baseiam-se na injeção de gases miscíveis em óleo, como CO<sub>2</sub>, cuja presença causa redução na viscosidade do petróleo, com conseqüente aumento de sua mobilização. Em geral, esses métodos ainda são pouco utilizados, fato atribuído à complexidade metodológica ou ao seu alto custo de implementação. Um exemplo disto

é o fato de que somente 10% de toda a produção americana de petróleo são provenientes da utilização de tais tecnologias (Ollivier e Magot, 2005).

### **2.1.2. Recuperação de petróleo melhorada por microrganismos**

Vários são os produtos e atividades microbianas potencialmente úteis para as práticas de MEOR. Dentre estes produtos, pode-se mencionar gases como CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>; ácidos, como ácido acético, butírico e lático; solventes, como etanol, butanol e acetona; polímeros, como polissacarídeos e proteínas; bioemulsificantes, como heteropolissacarídeos e proteínas; e biossurfactantes, como glicolipídeos e lipopeptídeos. Vários desses compostos possuem a capacidade de atuar sinergeticamente no aumento da produção de petróleo (Ollivier e Magot, 2005).

Os biossurfactantes são metabólitos ativos em superfície produzidos por microrganismos crescendo em compostos hidrossolúveis ou óleo. Essas moléculas possuem a propriedade característica de reduzir as tensões interfaciais ar-água e óleo-água de forma semelhante aos surfactantes sintéticos. Um grupo diverso de moléculas, compostas por diferentes estruturas químicas, pode atuar como biossurfactantes, como glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas (Mukherjee *et. al.*, 2006). Exemplos de biossurfactantes são: a surfactina produzida por *Bacillus subtilis* (Nakayama *et. al.*, 1997); a liquenisina produzida por *Bacillus licheniformis* (Lin *et. al.*, 1994); e os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (Pham *et. al.*, 2004).

Assim como os surfactantes sintéticos, os biossurfactantes possuem a habilidade de reduzir a tensão na interface óleo-rocha e óleo-fluido de injeção, reduzindo as forças capilares que previnem a movimentação do óleo pelos poros da rocha (Banat *et. al.*, 2000). A utilização de biossurfactantes como método de MEOR tem propiciado aumentos satisfatórios da recuperação de óleo, em experimentos de campo (Li *et. al.*, 2000) e de laboratório (Maugdalya *et. al.*, 2004; Okpokwasili e Ibiene, 2006), bem como o prolongamento da vida útil de reservatórios onde a prática foi implantada (Li *et. al.*, 2000).

As principais estratégias para a utilização de biossurfactantes na recuperação de petróleo são três, a saber: (1) a produção de biossurfactantes em cultura contínua ou em batelada, em escalas industriais, seguida da adição desses compostos ao reservatório

juntamente com a água de injeção, sendo esse processo denominado MEOR *ex situ*; (2) a adição de nutrientes selecionados ao reservatório, para estimular o crescimento da microbiota indígena produtora de biossurfactantes; (3) a injeção de células de uma cultura metabolicamente ativa dentro do reservatório, acompanhada da injeção de nutrientes necessários ao seu crescimento e produção de biossurfactantes *in situ* (Banat, 1995a). O custo da produção de biossurfactantes em larga escala, decorrente do baixo rendimento apresentado pelas culturas, é considerado uma restrição para a utilização da MEOR *ex situ* (Mukherjee *et. al.*, 2006). Já o sucesso das outras duas estratégias está vinculado à existência de microrganismos com potencial para a produção de biossurfactantes sob as severas condições ambientais apresentadas pelos reservatórios de óleo, como alta temperatura, pressão e salinidade, além de condições de baixa ou nenhuma pressão de oxigênio (Cameotra e Makkar, 1998). Neste âmbito, as espécies bacterianas do gênero *Bacillus* apresentam um grande destaque, já que têm sido reportadas como as únicas com potencial para a produção de biossurfactantes *in situ*.

## **2.2. Metabolismo anaeróbio em bactérias do gênero *Bacillus***

O gênero *Bacillus* é tipicamente composto por bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas. No entanto, poucas espécies possuem seu metabolismo anaeróbio bem caracterizado. Dentre elas podem ser destacadas as espécies *Bacillus subtilis* (Nakano e Zuber, 1998) e *B. licheniformis* (Shariati *et. al.*, 1995). *Bacillus subtilis* é um dos microrganismos mais estudados e bem caracterizados, utilizado tanto em pesquisa básica quanto em microbiologia aplicada (Nakano e Hulett, 1997). Anteriormente classificado como aeróbio estrito, o metabolismo anaeróbio de *B. subtilis* só foi evidenciado por Priest em 1993 (Priest, 1993), apesar de indícios da existência desse tipo de metabolismo já serem conhecidos, com a descoberta da produção de uma nitrato redutase pela espécie (Bohin *et. al.*, 1976). Atualmente, dois modelos de crescimento anaeróbio são descritos para essa espécie, respiração anaeróbia de nitrato (Shariati *et. al.*, 1995; Ramos *et. al.*, 1995; Glaser *et. al.*, 1995; Hoffmann *et. al.*, 1995; Schirawski e Uden, 1995; LaCelle *et. al.*, 1996; Nakano *et. al.*, 1996 e Sun *et. al.*, 1996) e crescimento fermentativo (Nakano *et. al.*, 1997 e Ramos *et. al.*, 2000). Na respiração anaeróbia do nitrato, este é utilizado como acceptor final de elétrons pela bactéria, sendo

sua redução etapa fundamental na conservação de energia pela célula. Esse fato pode ser facilmente comprovado, uma vez que *B. subtilis* é capaz de crescer anaerobicamente em meio mineral contendo nitrato e glicerol, que é uma fonte de carbono não-fermentável (Nakano *et. al.*, 1997; Clements *et. al.*, 2002). Nenhuma evidência de respiração anaeróbia de fumarato foi encontrada para a espécie.

Ao contrário de bactérias como *Escherichia coli*, *B. subtilis* apresenta uma fermentação de glicose bastante ineficiente. No entanto, esta via é estimulada pela presença de piruvato ou de uma mistura de aminoácidos. Uma possível explicação é que a quantidade de piruvato acumulado durante a glicólise não é suficiente para induzir a expressão de genes envolvidos no catabolismo fermentativo do mesmo, ou para ativar as enzimas que nele participam (Nakano *et. al.*, 1997). Neste caso, a adição de aminoácidos poderia estimular a fermentação, uma vez que alguns aminoácidos podem gerar piruvato. Reciprocamente, o excesso de piruvato poderia funcionar como substrato para a síntese de alguns aminoácidos, os quais não estariam sendo produzidos eficientemente durante a fermentação, justamente pela alta demanda por piruvato (Nakano *et. al.*, 1997).

O potencial redox é um fator ambiental que pode influenciar significativamente o crescimento microbiano. Espécies do gênero *Bacillus*, apesar de apresentarem metabolismo anaeróbio, apresentam algumas deficiências nutricionais quando submetidas a baixos potenciais redox, podendo este fato estar ligado à baixa atividade de algumas enzimas nesta condição (Folmsbee *et al.*, 2004). Algumas enzimas codificadas por microrganismos aeróbios, como a ribonucleotídeo redutase classe I, requerem a presença de oxigênio em seu estado ativo (Borovok *et al.*, 2004). Trabalhos que evidenciem a influência de diferentes potenciais redox no metabolismo de espécies do gênero *Bacillus* são escassos na literatura.

### **2.3. Crescimento anaeróbio e produção de biossurfactantes por *Bacillus* spp.**

Vários são os trabalhos que reportam o crescimento anaeróbio de isolados do gênero *Bacillus* acompanhado da produção de biossurfactantes, o que os torna potencialmente aplicáveis em operações de MEOR. Dentre esses, destaca-se o que reporta o crescimento de *B. licheniformis* JF-2 em anaerobiose estrita, em temperaturas



superiores a 50 °C, concentração salina de 100 g L<sup>-1</sup> e valores de pH variando de 4,0 a 9,0 (Javaheri et al., 1985). Os autores reportam ainda que os biossurfactantes produzidos pela bactéria são capazes de reduzir a tensão interfacial ar-água para valores inferiores a 27 mN/m, sendo essa atividade estável sob várias condições, com uma concentração micelar crítica (CMC) de 10 mg L<sup>-1</sup>, o que representa menos da metade da CMC obtida para a surfactina. Este isolado posteriormente foi re-identificado como *B. mojavensis* por Folmsbee et al. (2006). Destaca-se também o trabalho que demonstra o crescimento do isolado de *B. licheniformis* BAS50 em temperatura de 50 °C e concentração salina de 100 g L<sup>-1</sup>, com produção de biossurfactantes capazes de reduzir a tensão interfacial ar-água para valores inferiores a 29 mN/m, com estabilidade em concentrações salinas superiores a 400 g L<sup>-1</sup> (Yakimov et al., 1995). Os isolados de *B. licheniformis*, BNP29, BNP36, BAS50 e Mep132 por respiração de nitrato, em temperatura de 55 °C e salinidade de 120 g L<sup>-1</sup>, com a produção de aproximadamente 50 µg L<sup>-1</sup> de surfactantes (Yakimov et al., 1997). Além das espécies de *B. licheniformis* e *B. mojavensis*, a espécie *B. subtilis* ATCC21332 é reportada como produtora de surfactina em condição anaeróbia (Davis et al., 1999). A produção in situ de biossurfactantes por isolados de *Bacillus* foi detectada quando, juntamente com as células, foram injetados nutrientes em um reservatório de petróleo (Youssef et al., 2006). Em outro trabalho, foi reportada a redução da tensão interfacial óleo-água pela produção in situ de biossurfactantes por *B. subtilis* (Soudmand-asli et al., 2007).

#### **2.4. Fatores que afetam a produção de biossurfactantes**

O estudo das condições que propiciem a produção de biossurfactantes por isolados do gênero *Bacillus* apresenta-se como uma importante etapa na construção de uma metodologia de MEOR, dada a grande variabilidade entre as condições apresentadas pelos reservatórios de petróleo. Essas diferenças relacionam-se principalmente a fatores ambientais como temperatura (Ohno *et al.*, 1995; Amiriyan *et al.*, 2004; Tabatabaee *et al.*, 2005), pH (Makkar e Cameotra, 1997; Makkar e Cameotra, 1998; Wie *et al.*, 2003; Wie *et al.*, 2004; Mukherjee e Das, 2005), salinidade (1995; Makkar e Cameotra, 1997; Mukherjee e Das, 2005) e potencial redox (Davis *et al.*, 1999), além de fatores nutricionais como fontes de carbono, nitrogênio (Kim *et al.*,

1997; Makkar e Cameotra, 1997; Makkar e Cameotra, 1998; Davis *et al.*, 1999; Roongsawang *et al.*, 2002; Mukherjee e Das, 2005) e micronutrientes como ferro (Wei e Chu, 1998; Wie *et al.*, 2004) e manganês (Wei e Chu, 2002), os quais influenciam significativamente o crescimento microbiano e a produção de biossurfactantes.

Todos os fatores que influenciam diretamente o crescimento microbiano potencialmente afetam também a produção de biossurfactantes, principalmente no que diz respeito ao rendimento da produção. Assim, o menor rendimento na produção de biossurfactantes associado à menor produção de biomassa bacteriana, é atribuído tanto ao tipo de fonte de carbono utilizada quanto às altas salinidades do meio (Mukherjee e Das, 2005). Condições de baixo pH também inibem o crescimento e a produção de biossurfactantes por *B. subtilis* (Makkar e Cameotra, 1997). O metabolismo de nitrogênio é uma importante variável na produção de biossurfactantes, uma vez que tanto a fonte (Makkar e Cameotra, 1997; Makkar e Cameotra, 1998) quanto a concentração de N podem afetar a produção desses compostos (Davis *et al.*, 1999).

Além da influência indireta do ambiente sobre a produção de biossurfactantes, alguns fatores podem influenciar diretamente a estrutura e atividade desses compostos. A fonte de carbono, particularmente o tipo de carboidrato, exerce grande efeito sobre o tipo de glicolípido produzido por *B. subtilis*. (Makkar e Cameotra, 1997; Makkar e Cameotra, 1998). Como exemplo, mencionam-se a alteração no perfil de lipopeptídeos produzidos pelo isolado *B. subtilis* BBK-1, produtor de bacilomicina L, plipastatina e surfactina (Roongsawang *et al.*, 2002) e a ocorrência de alterações na razão entre iturina A e surfactina produzidas pelo isolado *B. subtilis* RB14 mediante alterações de temperatura (Ohno *et al.*, 1995). Outro fator que pode afetar diretamente a estrutura e a estabilidade dos biossurfactantes produzidos é o pH. A lichenisina, biossurfactante produzido pelo isolado *B. licheniformis* JF-2, apresenta estabilidade em valores de pH acima de 4,6 (Javaheri *et al.*, 1985); já a surfactina produzida por *B. subtilis* precipita em pH inferior a 5,0, o que impossibilita sua utilização em ambientes ácidos (Wie *et al.*, 2003; Wie *et al.*, 2004).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Isolados bacterianos

Os isolados *Bacillus subtilis* LBBMA155, *Bacillus* sp. LBBMA111A e *Bacillus* sp. LBBMA283 foram utilizados para a realização de todos os experimentos propostos. Esses isolados pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA), situado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, Universidade Federal de Viçosa (UFV). Esses isolados foram escolhidos por possuírem características desejáveis à sua aplicação em MEOR, como crescimento em temperaturas superiores a 40 °C e em salinidade de 2 a 70 g L<sup>-1</sup> de NaCl e, além disso, por serem capazes de produzir biossurfactantes em condição aeróbia.

#### 3.2. Crescimento anaeróbio dos isolados de *Bacillus* spp. em meio MM reduzido

Em experimentos preliminares, constatou-se que os isolados bacterianos LBBMA155 e LBBMA283 não apresentam crescimento em meio MM reduzido com 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de ditionitrito. Somente o isolado LBBMA111A apresentou crescimento nesta condição. Na tentativa de se promover o crescimento das bactérias, o meio MM

foi suplementado com glicose a  $30 \text{ g L}^{-1}$  além de proteose peptona, extrato de levedura ou casaminoácidos. Os isolados LBBMA155 e LBBMA283 foram previamente crescidos em aerobiose em meio R2A por 16 horas a  $30^\circ \text{ C}$  e 200 rpm. As bactérias foram centrifugadas a  $8.800 \text{ g}$  por 10 minutos e lavadas duas vezes em salina estéril a  $8,5 \text{ g L}^{-1}$ . As células foram introduzidas em câmara anaeróbia, ressuspensas em solução salina anaeróbia estéril e inoculadas em meio MM reduzido contendo glicose a  $30 \text{ g L}^{-1}$  e suplementado com proteose peptona, extrato de levedura ou casaminoácidos, todos a uma concentração de  $30 \text{ g L}^{-1}$ , de modo a se obter densidade ótica a  $600 \text{ nm}$  (DO) inicial de 0,1. Os tratamentos foram montados em frascos de penicilina de 50 mL lacrados com tampa de borracha e lacres de alumínio. As bactérias foram incubadas estaticamente por 30 horas a  $30^\circ \text{ C}$ . A avaliação do crescimento foi feita por meio da leitura da  $\text{DO}_{600}$  ao final do período de incubação.

Para se determinar o fator nutricional restritivo ao crescimento dos isolados em meio com potencial redox reduzido, o meio MM foi suplementado com os seguintes fatores de crescimento: uma solução mista de aminoácidos composta de glutamato, fenilalanina, tirosina, glutamina, triptofano, asparagina e metionina, todos a  $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ; bases nitrogenadas: uma solução mista de bases de ácidos nucleicos, composta de adenina, citosina, guanina, timina e uracila, todas na concentração final de  $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ; DNA de *E. coli*; DNA de *Kluyveromyces lactis*; DNA de cebola (*Allium cepa*) e DNA de esperma de arenque (Sigma D3159), todos na concentração final de  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ .

Os isolados LBBMA155 e LBBMA283 foram previamente crescidos em aerobiose em meio R2A por 16 horas a  $30^\circ \text{ C}$  e 200 rpm. As bactérias foram lavadas duas vezes e inoculadas anaerobicamente, como descrito anteriormente, em meio MM reduzido com  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de ditioneitol, suplementado com glicose a  $30 \text{ g L}^{-1}$  e todos os tratamentos com os fatores de crescimento descritos acima, de modo a se obter  $\text{DO}_{600}$  inicial de 0,1. Os tratamentos foram montados em frascos de penicilina de 50 mL lacrados com tampa de borracha e lacres de alumínio. As bactérias foram incubadas estaticamente por 30 horas a  $30^\circ \text{ C}$ . A avaliação do crescimento foi feita por leitura da  $\text{DO}_{600}$  ao final das 30 horas.

Para obtenção de inóculos com células adaptadas à anaerobiose, foi seguido o seguinte procedimento: os isolados foram previamente crescidos em aerobiose em meio R2A por 16 horas a  $30^\circ \text{ C}$  e 200 rpm. As bactérias foram centrifugadas a  $8.800 \text{ g}$  por 10 minutos e lavadas duas vezes em salina estéril a  $8,5 \text{ g L}^{-1}$ . As células foram introduzidas em câmara anaeróbia, ressuspensas em salina anaeróbia estéril e inoculadas em meio

MM anaeróbio suplementado com glicose a  $30 \text{ g L}^{-1}$  e proteose peptona a  $30 \text{ g L}^{-1}$ , de modo a se obter uma  $\text{DO}_{600}$  inicial de 0,1. As bactérias foram incubadas estaticamente por 30 horas a  $30^\circ \text{ C}$ . Após esse período, foram centrifugadas a  $8.800 \text{ g}$  por 10 minutos a  $4^\circ \text{ C}$  e lavadas duas vezes em salina estéril. As células foram introduzidas em câmara anaeróbia e finalmente ressuspensas em salina anaeróbia estéril.

Todas as soluções-estoque foram esterilizadas por autoclavagem a  $120^\circ \text{ C}$  por 20 minutos e subsequentemente desoxigenadas por repetidas sessões de evacuação e repressurização com 100% de  $\text{N}_2$ , sendo adicionadas ao meio anaeróbio já autoclavado. A manipulação das culturas e soluções anaeróbias foi feita em câmara anaeróbia (Anaerobic System THERMOFORMA), sob atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , 10% de  $\text{H}_2$  e 85% de  $\text{N}_2$ .

### **3.3. Efeito de diferentes concentrações de ditiotreitól no crescimento dos isolados e na produção de biossurfactantes**

O estudo do efeito de diferentes concentrações de ditiotreitól no crescimento dos isolados e na produção de biossurfactantes pelos isolados LBBMA111A, LBBMA155 e LBBMA283 foi realizado com células previamente crescidas em aerobiose em meio R2A por 16 horas a  $30^\circ \text{ C}$  e 200 rpm. Após este período, as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes antes de serem introduzidas em câmara de anaerobiose e inoculadas em meio MM anaeróbio suplementado com glicose e proteose peptona, ambos a  $30 \text{ g L}^{-1}$ . As culturas foram incubadas estaticamente por 30 horas a  $30^\circ \text{ C}$ . Após o período de incubação, as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes antes de serem introduzidas em câmara de anaerobiose e inoculadas em meio MM suplementado com glicose a  $30 \text{ g L}^{-1}$  e reduzido com ditiotreitól nas concentrações de 0, 0,125, 0,25 e  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , de modo a apresentar  $\text{DO}_{600}$  inicial de 0,1. Para os isolados LBBMA155 e LBBMA283, foram repetidos os mesmos tratamentos com ditiotreitól em meio MM suplementado com glicose a  $30 \text{ g L}^{-1}$  e DNA a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . As culturas foram então incubadas estaticamente a  $30^\circ \text{ C}$ . O crescimento microbiano foi estimado por meio de leituras de  $\text{DO}_{600}$  até o início da fase estacionária de crescimento.

A produção de biossurfactantes foi determinada estimando-se a diluição micelar crítica dos biossurfactantes (DMC) não-purificados nas culturas, sendo esta

procedida de acordo com o método descrito no item 3.5. A avaliação do índice de emulsificação inicial (EI) e da estabilidade das emulsões (E24) das culturas foi procedida de acordo com o método descrito no item 3.6.

### Composição dos meios MM e R2A

Meio MM		Meio R2A <sup>1</sup>	
Componente	Quantidade	Componente	Quantidade
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	13,900 g	Extrato de levedura	0,50 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,700 g	Proteose peptona	0,50 g
Extrato de levedura	1,000 g	Casaminoácidos	0,50 g
NaNO <sub>3</sub>	1,000 g	Glicose	0,50 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,000 g	Amido solúvel	0,50 g
MgSO <sub>4</sub>	0,250 g	Piruvato de sódio	0,30 g
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,001 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,30 g
Solução de metais*	10,0 mL	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,05 g
Água	1000,0 mL	Água	1000,0 mL

1 – Reasonere e Geldreich (1985)

#### \* Solução de metais<sup>2</sup>

Componentes	Quantidade (g L <sup>-1</sup> )
EDTA	1,00
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	3,00
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,10
CoCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,10
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,10
CuSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,01
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,01
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01

2 - Folmsbee *et al.* (2004)

### **3.4. Influência das fontes de carbono e nitrogênio no crescimento dos isolados e na produção de biossurfactantes**

Para se determinar a influência das fontes de carbono e nitrogênio, o experimento foi montado em um fatorial (4 x 3), onde o meio MM foi suplementado com quatro fontes de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ): glicose (30), sacarose (30), amido (10) ou piruvato de sódio (20); e três fontes de nitrogênio ( $\text{g L}^{-1}$ ): nitrato de sódio (1,0), fosfato de amônio (1,0) ou proteose peptona (3,0). Ressalta-se que o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  normalmente presente no meio MM foi substituído, quando necessário, para que fossem compostos os três tratamentos de nitrogênio. A concentração de extrato de levedura, normalmente presente a  $1 \text{ g L}^{-1}$  no meio MM, foi reduzida para  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  neste experimento, para não influenciar os tratamentos de fonte de carbono e nitrogênio. Os experimentos foram montados no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições.

Os isolados LBBMA111A, LBBMA155 e LBBMA283 foram previamente crescidos em aerobiose em meio R2A por 16 horas a  $30^\circ \text{ C}$  e 200 rpm. Após este período, as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes antes de serem introduzidas em câmara de anaerobiose e inoculadas em meio MM anaeróbio, suplementado com glicose e proteose peptona, ambos a  $30 \text{ g L}^{-1}$ , para a preparação do inóculo adaptado à anaerobiose. As culturas foram incubadas estaticamente por 30 horas a  $30^\circ \text{ C}$ . Após o período de incubação, as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes antes de serem reintroduzidas em câmara de anaerobiose e inoculadas em meio MM, suplementado com DNA a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  e com as fontes de carbono e nitrogênio definidas para cada tratamento. A  $\text{DO}_{600}$  inicial foi de 0,1. O crescimento microbiano foi estimado por meio de leituras de  $\text{DO}_{600}$  até o início da fase estacionária de crescimento.

A produção de biossurfactantes foi estimada por meio da determinação da diluição micelar crítica dos biossurfactantes (DMC) não-purificados nas culturas. As avaliações do índice de emulsificação inicial (EI) e da estabilidade das emulsões (E24) das culturas foram efetuadas de acordo com o método descrito no item 3.6.

### **3.5. Leitura das tensões interfaciais ar-líquido e estimação da diluição micelar crítica (DMC) das culturas**

A concentração micelar crítica dos biossurfactantes (DMC) não-purificados nas culturas foi estimada por meio da medição da tensão interfacial pelo método do anel de du Nouy (COOPER *et al.*, 1979). As diluições das culturas foram preparadas em água destilada, sendo a tensão interfacial das diluições da cultura quantificada em tensiômetro (Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA). A DMC foi estimada após a elaboração de gráficos de tensão interfacial *versus* diluição da cultura, como o recíproco da diluição micelar crítica, na qual a tensão interfacial começa a aumentar (COOPER *et al.*, 1979). Para o cálculo da DMC foram considerados como redução efetiva da tensão interfacial ar-líquido os valores iguais ou inferiores a  $40 \text{ mJ m}^{-2}$  (COOPER *et al.*, 1979). Essa avaliação foi realizada com três repetições para cada tratamento.

### **3.6. Avaliação do índice de emulsificação inicial (EI) e da estabilidade das emulsões (E24) das culturas**

A avaliação do índice de emulsificação inicial (EI) e da estabilidade das emulsões (E24) foi feita utilizando-se as culturas bacterianas produzidas durante os experimentos. As culturas permaneceram incubadas a  $30^\circ \text{ C}$  por 5 dias após as bactérias atingirem a fase estacionária de crescimento. Para a obtenção das emulsões, foi misturado a 2 mL da cultura um mesmo volume de querosene em tubo de vidro (100 mm X 15 mm). O tubo foi vedado com Parafilm (American National Can TM), agitado vigorosamente por dois minutos e deixado em repouso por dois minutos, medindo-se a seguir a altura da emulsão formada. O índice EI foi considerado como sendo o volume inicial da emulsão formada. A estabilidade das emulsões foi avaliada 24 horas após o início do ensaio. O volume de emulsão inicial (VE (%)) foi calculado pela fórmula:

$$\text{VE (\%)} = \frac{\text{altura da emulsão (mm)} \times \text{área da secção transversal (mm)}^2 \times 100}{\text{Volume total (= } 4000 \text{ mm}^3)}$$



A estabilidade da emulsão E24 (%), após 24 horas foi quantificada pela fórmula:

$$E24 (\%) = \frac{VE_{24}(\%)}{VE_0(\%)} \times 100$$

Sendo:  $VE_{24}(\%)$  = Volume de emulsão medida após 24 horas

$VE_0(\%)$  = Volume inicial de emulsão formado

### **3.7. Análise dos produtos do metabolismo anaeróbio dos isolados**

Alíquotas de 1 mL das culturas foram coletadas ao final do crescimento das bactérias, centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes foram armazenados a 4° C até o momento da análise por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). As análises foram efetuadas em equipamento de HPLC modelo 1050 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA), equipado com um detector de índice de refração (HP 1047A) e uma coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (370 X 7,8 mm). Uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,02 mol L<sup>-1</sup> foi usada como fase móvel, com fluxo de 0,7 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura da coluna foi de 60° C. Foram injetados 20 µL de cada amostra para a análise cromatográfica, em que foi avaliada a presença de lactato, acetato, etanol, succinato e butirato.

### **3.8. Análise Estatística**

Todos os experimentos foram montados no delineamento inteiramente casualizado e os resultados de cada experimento analisados por ANOVA, pelo teste F, a 5% de probabilidade. Posteriormente, quando necessário, foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade para os dados dependentes de efeito qualitativo. Os dados dependentes de efeito quantitativo foram avaliados por regressão.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Crescimento anaeróbio dos isolados de *Bacillus* spp.

Os isolados de *Bacillus* LBBMA155, LBBMA283 e LBBMA111A foram capazes de crescer em meio MM contendo nitrato como aceptor de elétrons, atingindo, respectivamente, DO<sub>600</sub> máxima de 0,542, 0,455 e 0,889 após 30 horas de cultivo a 30° C (Tabela 1). Durante a avaliação do crescimento dos três isolados, iniciado com inóculos produzidos em condição aeróbia, foi observada a ocorrência de fases lag superiores a 10 horas (dados não-mostrados). Durante essa fase lag, ocorre a ativação dos genes envolvidos na regulação do crescimento anaeróbio em *Bacillus* spp., como *resDE* e *fnr* (Nakano e Hulett, 1997). Esses genes codificam fatores que controlam a expressão de genes necessários à respiração do nitrato, como uma redutase do nitrato codificada pelos genes *narGHJI* (LaCelle et al., 1996) e uma proteína responsável pela extrusão do nitrito, codificada pelo gene *narK* (DeMoss e Hsu, 1991). Em meio MM reduzido com 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de ditionitrito, somente o isolado LBBMA111A apresentou crescimento, atingindo DO<sub>600</sub> máxima de 0,742 (Tabela 1). Esse resultado demonstra que o crescimento dessa bactéria é pouco sensível ao potencial redox do meio. Espécies dos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* apresentam ampla distribuição nos ambientes, sendo adaptadas a condições ambientais extremas, como temperaturas elevadas (Makkar e Cameotra, 1997), elevada salinidade (Roongsawang et al., 2002.), elevada pressão hidrostática, acidez (Wie et al., 2003; Wie et al., 2004.), alcalinidade (Krulwich et al., 2001) e baixos potenciais redox (Zigha et al., 2006).

A adição de proteose peptona a 30 g L<sup>-1</sup> ao meio MM reduzido com ditionitrito propiciou o crescimento anaeróbio dos isolados LBBMA155 e LBBMA283. Esse efeito foi observado somente quando o meio foi esterilizado por autoclavagem, sendo anulado quando a esterilização do meio de cultura foi feita por filtração. Esse resultado evidencia a presença de algum fator de crescimento na proteose peptona cuja modificação pela autoclavagem possibilita o crescimento anaeróbio dos isolados LBBMA 155 e LBBMA 283 em meio MM reduzido. O meio MM reduzido foi então suplementado com DNA, bases e aminoácidos, com o intuito de se elucidar qual

requerimento nutricional foi suprido pela adição de proteose peptona seguida da autoclavagem do meio.

Não houve crescimento dos isolados LBBMA155 e LBBMA283 em meio MM reduzido e suplementado com uma solução de aminoácidos contendo glutamato, glutamina, fenilalanina, tirosina, triptofano e metionina ou casaminoácidos (Tabela 1). Esses aminoácidos foram, portanto, excluídos como o fator determinante do crescimento em meio MM reduzido suprido pela proteose peptona.

A adição de DNA obtido de várias fontes, incluindo DNA de cebola (*Allium cepa*), DNA da levedura *Kluyveromyces lactis*, DNA de *Escherichia coli* e DNA de esperma de arenque, possibilitou o crescimento dos isolados LBBMA155 e LBBMA283 em meio MM reduzido (Tabela 1), obtendo-se DO<sub>600</sub> máxima de 0,806 para o isolado LBBMA 155 e de 0,920 para o isolado LBBMA 283. Por outro lado, a adição de precursores como adenina, timina, citosina e guanina também favoreceu o crescimento nesse meio, mas o efeito foi inferior ao obtido com a adição de DNA (Tabela 1).

O requerimento de DNA para o crescimento anaeróbio de bactérias do gênero *Bacillus* é incomum. No entanto, resultados similares foram reportados por Folmsbee *et. al.* (2004), que demonstraram o requerimento de DNA ou desoxirribonucleosídeos para crescimento de *Bacillus mojavensis* JF-2 e *Bacillus subtilis* 168 em meio basal reduzido com cisteína/HCl. A enzima responsável pela manutenção de concentrações adequadas de desoxirribonucleotídeos no interior da célula é a ribonucleotídeo redutase (Jordan e Reichard, 1998). Esses autores reportam a existência de três principais classes de ribonucleotídeo redutases, a saber: (1) a enzima de Classe I, que requer oxigênio molecular para gerar o radical tirosil, necessário para a redução do ribonucleotídeo a desoxirribonucleotídeo; (2) a enzima de classe II, que não requer oxigênio para sua

Tabela 1 - Densidade ótica ( $DO_{600}$ ) máxima de três isolados de *Bacillus* crescendo em meio MM suplementado com diversos fatores de crescimento

Tratamento	Isolado		
	LBBMA155	LBBMA283	LBBMA111A
Meio MM <sup>1</sup>	0,542	0,455	0,889
Meio MM reduzido <sup>2</sup>	< 0,1	< 0,1	0,742
MM reduzido + Proteose peptona <sup>3</sup>	1,024	1,220	ND
MM reduzido + Proteose peptona (Filtrado) <sup>4</sup>	< 0,1	< 0,1	ND
MM reduzido + DNA <sup>5</sup>	0,806	0,920	ND
MM reduzido + Bases <sup>6</sup>	0,319	0,323	ND
MM reduzido + Casaminoácidos <sup>7</sup>	< 0,1	< 0,1	ND
MM reduzido + Aminoácidos <sup>8</sup>	< 0,1	< 0,1	ND
MM reduzido (Células adaptadas) <sup>9</sup>	0,586	0,636	0,886
MM reduzido + DNA (Células adaptadas) <sup>10</sup>	1,010	0,961	ND

ND – Não determinado

Em todos os tratamentos, exceto no 9 e 10, os isolados foram crescidos em aerobiose em meio R2A e inoculados nos seguintes tratamentos:

1 - Meio MM anaeróbio não-reduzido.

2 - Meio MM reduzido com 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de ditioneitol.

3 - Meio MM + 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de ditioneitol + proteose peptona a 30 g L<sup>-1</sup> e autoclavado.

4 - Meio MM + 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de ditioneitol + proteose peptona a 30 g L<sup>-1</sup> e esterilizado por filtração.

5 - Meio MM reduzido com 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de ditioneitol e suplementado com DNA a 10 mg L<sup>-1</sup>.

6 - Meio MM + 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de ditioneitol + adenina, timina, citosina, guanina e uracila a 0,1 g L<sup>-1</sup> cada.

7 - Meio MM + 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de ditioneitol + casoaminoácidos a 30 g L<sup>-1</sup> e autoclavado.

8 - Meio MM + 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de ditioneitol + glutamato, fenilalanina, tirosina, glutamina, triptofano, asparagina e metionina, todos a 0,1 g L<sup>-1</sup>

9 - Os isolados foram crescidos em anaerobiose em meio MM + proteose peptona e inoculados em meio MM + ditioneitol a 0,5 mmol L<sup>-1</sup>.

10 - Os isolados foram crescidos em anaerobiose em meio MM + proteose peptona e inoculados em meio MM + ditioneitol a 0,5 mmol L<sup>-1</sup> + DNA a 10 mg L<sup>-1</sup>.

atividade e nem é sensível a ele, funcionando tanto em aerobiose quanto em anaerobiose; (3) a enzima de classe III, sensível ao oxigênio e ativa somente em condições anaeróbias. Folmsbee et. al. (2004) argumentam que o tipo de ribonucleotídeo redutase presente nas células pode explicar o motivo pelo qual algumas bactérias requerem DNA para crescer sob condições anaeróbias em meios reduzidos. Segundo esses autores, os isolados *Bacillus mojavensis* JF-2 e *Bacillus subtilis* 168 possuem uma ribonucleotídeo redutase classe I, que não é capaz de proporcionar o crescimento anaeróbio, requerendo por isso a presença de oxigênio ou de desoxirribonucleotídeos.

Härtig et. al. (2006) reportam que uma ribonucleotídeo redutase classe Ib, codificada por *B. subtilis*, é essencial tanto para o crescimento aeróbio quanto anaeróbio. Ressaltam ainda que mutações no sítio regulador da expressão da enzima podem levar ao fenótipo em que as bactérias necessitam de desoxirribonucleosídeos para crescerem em anaerobiose. O crescimento em aerobiose não é afetado, porque os mecanismos de regulação nessa condição são diferentes daqueles utilizados sob anaerobiose.

Neste trabalho, observou-se que o padrão de crescimento dos três isolados de *Bacillus* em meio MM reduzido é alterado quando os inóculos são produzidos em condição anaeróbia, comparativamente ao padrão de crescimento obtido com a utilização de inóculos produzidos em aerobiose. O isolado LBBMA111A apresentou fase lag de apenas quatro horas, atingindo uma DO<sub>600</sub> máxima de 0,886 em pouco mais de 20 horas (Figura 1A). Essa redução da fase lag é explicada pelo fato das células já estarem adaptadas à condição anaeróbia. Preparações microscópicas demonstraram que a redução da DO<sub>600</sub> da cultura após 20 horas de crescimento é atribuída à formação de endósporos pelas células do isolado LBBMA111A (dados não-mostrados), evento comum em espécies desse gênero e bem caracterizado em *B. subtilis*. Os processos que envolvem a regulação da esporulação nesta espécie são bem revisados por Errington (2003).

Culturas dos isolados LBBMA155 e LBBMA283 iniciadas com células pré-adaptadas à condição anaeróbia apresentaram crescimento em meio MM reduzido, mesmo sem a adição de DNA. Nessa condição, não foi observada a ocorrência de fase lag (Figura 1B e 1C). A constatação de que inóculos produzidos em condição anaeróbia mantêm o crescimento desses isolados em meio reduzido sem suplementação com DNA, comprovando a capacidade de síntese de seus precursores, e que o mesmo não

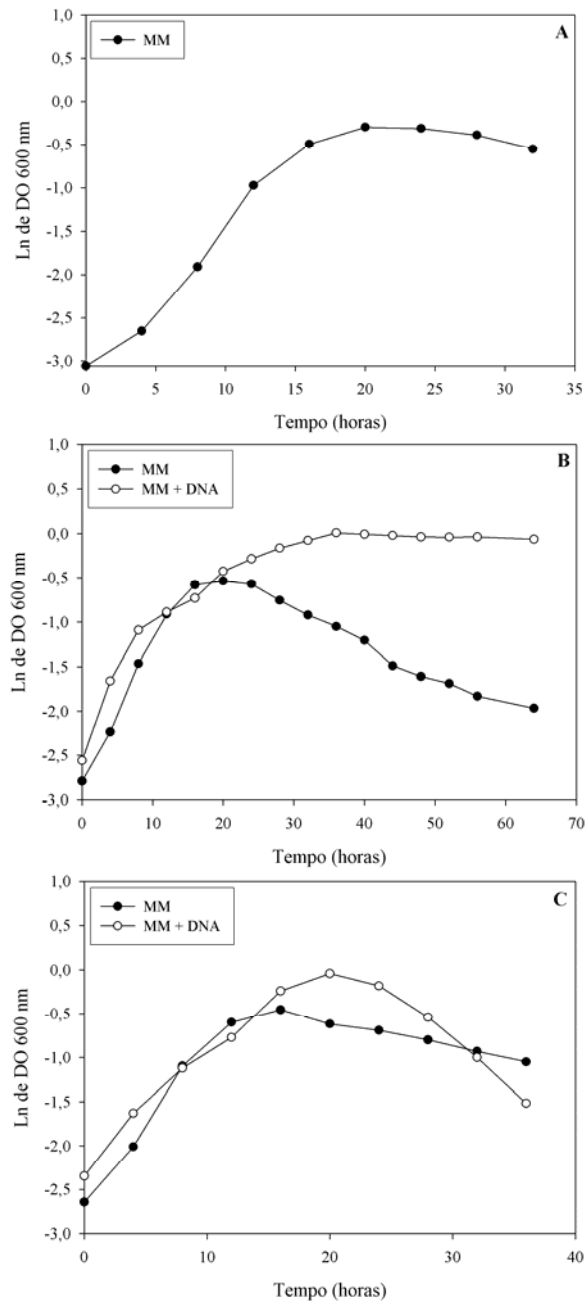


Figura 1 - Crescimento anaeróbio dos isolados de Bacillus: (A) LBBMA111A em meio MM reduzido com  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de ditiotreitól na ausência de DNA; (B) LBBMA155 e (C) LBBMA283 em meio MM reduzido com  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de ditiotreitól, suplementado ou não com DNA a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Os isolados foram crescidos em anaerobiose em meio MM suplementado com glicose e proteose peptona, ambos a  $30 \text{ g L}^{-1}$  por 30 horas a  $30^\circ \text{ C}$ . Após esse período, as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes em salina  $8,5 \text{ g L}^{-1}$ . As células foram introduzidas em câmara anaeróbia, ressuspensas em salina anaeróbia  $8,5 \text{ g L}^{-1}$  e inoculadas em meio MM anaeróbio, contendo os tratamentos descritos acima, de modo a se obter uma  $\text{DO}_{600}$  inicial de 0,1.

ocorre quando se utilizam células obtidas em condição aeróbia, parece indicar o envolvimento de duas classes diferentes de ribonucleotídeo redutase nesses organismos. Neste caso, a enzima funcional na ausência de oxigênio seria expressa somente quando as células estão adaptadas ao metabolismo anaeróbio, e não quando células obtidas em condição aeróbia são transferidas diretamente para meios com baixo potencial redox. Nessas células, uma outra enzima, a exemplo da ribonucleotídeo redutase Classe I, estaria sendo expressa. Embora plausível, essa hipótese não encontra respaldo na literatura consultada, e sua confirmação dependerá de trabalhos específicos que fogem ao escopo deste trabalho.

A adição de DNA ao meio MM reduzido, juntamente com a utilização de células adaptadas, favoreceu o crescimento dos isolados LBBMA155 e LBBMA283. Nessa condição, as culturas apresentaram DO<sub>600</sub> final de 1,0 e 0,96, respectivamente, resultados superiores aos obtidos em meio MM reduzido sem a adição de DNA (Figuras 1B e 1C). O maior crescimento dos dois isolados na presença de DNA indica que a disponibilidade de desoxirribonucleotídeos é um dos fatores limitantes ao crescimento dessas bactérias em condição de baixo potencial redox.

Foi observada uma redução da DO<sub>600</sub> na cultura do isolado LBBMA155, após 24 horas de crescimento em meio MM reduzido. Em meio suplementado com DNA, não foi detectada redução da DO<sub>600</sub>, mesmo após 50 horas de cultivo (Figura 1B). Também foi observada uma redução da DO<sub>600</sub> nas culturas do isolado LBBMA283 crescido em meio MM reduzido, tanto na presença quanto na ausência de DNA. Porém, essa redução foi mais acentuada em meio MM reduzido suplementado com DNA (Figura 1C). Como relatado anteriormente para o isolado LBBMA 111A, essa redução na DO<sub>600</sub> das culturas de ambos os isolados foi também atribuída à esporulação das células bacterianas. Normalmente, a esporulação em espécies do gênero *Bacillus* está ligada à desnutrição por carbono, nitrogênio ou fosfato (Dunny e Leonard, 1997). No entanto, fatores como a densidade celular influenciam na indução da formação de endósporos pelas bactérias. O acúmulo de peptídeos como PhrA e CSF em culturas com alta concentração celular constitui uma etapa primordial da cascata de sinalização que leva à diferenciação de endósporos em *B. subtilis* (Lazazzera *et. al.*, 1999).

O crescimento dos três isolados foi caracterizado como respiração anaeróbia de nitrato, uma vez que os mesmos não apresentaram crescimento fermentativo em meio MM suplementado com glicose a 30 g L<sup>-1</sup>, na ausência desse aceptor de elétrons.

Porém, nenhum dos isolados apresentou crescimento na presença de nitrato e glicerol, que é uma fonte de carbono não-fermentável (dados não-mostrados).

Análises por HPLC demonstraram a presença de produtos de fermentação no sobrenadante das culturas, ao final do crescimento dos três isolados em meio MM suplementado com glicose a  $30 \text{ g L}^{-1}$  e nitrato a  $1 \text{ g L}^{-1}$  (Anexo 1). Os principais produtos de fermentação produzidos pelos três isolados foram lactato e acetato. Também foi detectada a presença de etanol no sobrenadante da cultura do isolado LBBMA155 e de butirato no sobrenadante das culturas dos isolados LBBMA111A e LBBMA283, porém em uma proporção menor em relação ao lactato e o acetato. Esses resultados estão de acordo com os dados apresentados na literatura. Ramos *et. al.* (2000) afirmam que, em *B. subtilis*, a produção de ácidos orgânicos, como lactato e acetato, não é restrita ao metabolismo fermentativo, e independe da presença de aceptores alternativos de elétrons. Ressaltam ainda que as vias de produção desses ácidos orgânicos são de extrema importância no metabolismo energético anaeróbio dessa bactéria.

Mudanças sutis foram observadas no tipo e na concentração dos ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias, quando submetidas a diferentes concentrações do redutor ( $0,125$ ;  $0,250$  e  $0,500 \text{ mmol L}^{-1}$  de ditiotreitól). Todavia, não foi observada nenhuma mudança que possa indicar alterações significativas no metabolismo bacteriano.

#### **4.2. Efeito de diferentes concentrações de ditiotreitól no crescimento anaeróbio e produção de biossurfactantes pelos isolados de *Bacillus* spp.**

As concentrações de  $0$ ,  $0,125$ ,  $0,25$  e  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  do redutor resultaram em potenciais redox de  $+27$ ,  $-104$ ,  $-158$  e  $-228 \text{ mV}$ , respectivamente. Na presença do agente redutor, o isolado LBBMA111A apresentou comportamento diferenciado dos demais isolados. A bactéria apresentou crescimento considerado satisfatório em todos os tratamentos. O melhor crescimento do isolado LBBMA111A foi obtido no tratamento sem redutor, no qual foi obtida uma  $\text{DO}_{600}$  máxima de  $1,0$  (Figura 2A e Tabela 2). O crescimento no meio contendo as demais concentrações do agente redutor foi essencialmente idêntico, o que indica que o isolado é pouco influenciado pelo potencial redox do meio. Foi observada uma redução da densidade óptica em todos os tratamentos, sendo esta mais acentuada no tratamento sem redutor (Figura 2A). Como já



mencionado no item 4.1, a redução da densidade óptica foi atribuída à formação de endósporos pelas células.

Os isolados LBBMA155 e LBBMA283 apresentaram padrões de crescimento semelhantes em resposta às diferenças de potencial redox do meio de cultura (Figuras 2B e 2C). À semelhança do ocorrido com o isolado LBBMA 111A, o maior crescimento desses isolados foi obtido no meio sem redutor. Curiosamente, as concentrações intermediárias (0,125 e 0,25 mmol L<sup>-1</sup>) foram as mais restritivas ao crescimento de ambos os isolados, em comparação com a concentração de 0,5 mmol L<sup>-1</sup>. Para o isolado LBBMA283, o tratamento com 0,25 mmol L<sup>-1</sup> de redutor foi o que proporcionou menor crescimento (Tabela 2), embora nessa condição o crescimento tenha sido similar ao obtido na concentração de 0,125 mmol L<sup>-1</sup>. Para o isolado LBBMA155, os três tratamentos com redutor proporcionaram DO<sub>600</sub> máxima semelhante (Tabela 2). No entanto, a fase log de crescimento prolongou-se por mais tempo no tratamento com 0,5 mmol L<sup>-1</sup> quando comparada aos demais tratamentos com redutor (Figura 2B), de modo que a máxima DO<sub>600</sub> foi alcançada numa fase mais prematura. Esse prolongamento da fase log de crescimento no tratamento com 0,5 mmol L<sup>-1</sup> do agente redutor foi igualmente observado com o isolado LBBMA 283 (Figura 2C). As fases de declínio da DO<sub>600</sub> (formação de endósporos) observadas para os dois isolados no tratamento sem redutor foram mais acentuadas do que as observadas no tratamento com 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de redutor. Não foi observada fase de declínio nos tratamentos com concentrações intermediárias de redutor para o isolado LBBMA155. Já o isolado LBBMA283 apresentou fases de declínio pouco evidentes nestes mesmos tratamentos.

São poucos os trabalhos que descrevem a influência do potencial redox no metabolismo anaeróbio de espécies do gênero *Bacillus*. As alterações no potencial redox do meio influenciam significativamente as reações de oxi-redução celular (Kirakosyan *et al.*, 2004), assim como os fluxos de elétrons e carbono (Zigha *et al.*, 2006). Riondet *et al.* (2000) observaram alteração nas proporções dos produtos de fermentação de *Escherichia coli* em resposta a alterações no potencial redox do meio. Os autores afirmam que essas alterações são devidas principalmente a modificações na atividade específica de enzimas como a lactato desidrogenase. Zigha *et al.* (2006) encontraram resultados semelhantes para um isolado de *Bacillus cereus*. Esses autores observaram uma redução na produção de ATP, assim como na taxa específica de crescimento da bactéria quando crescida em meio com baixo potencial redox.

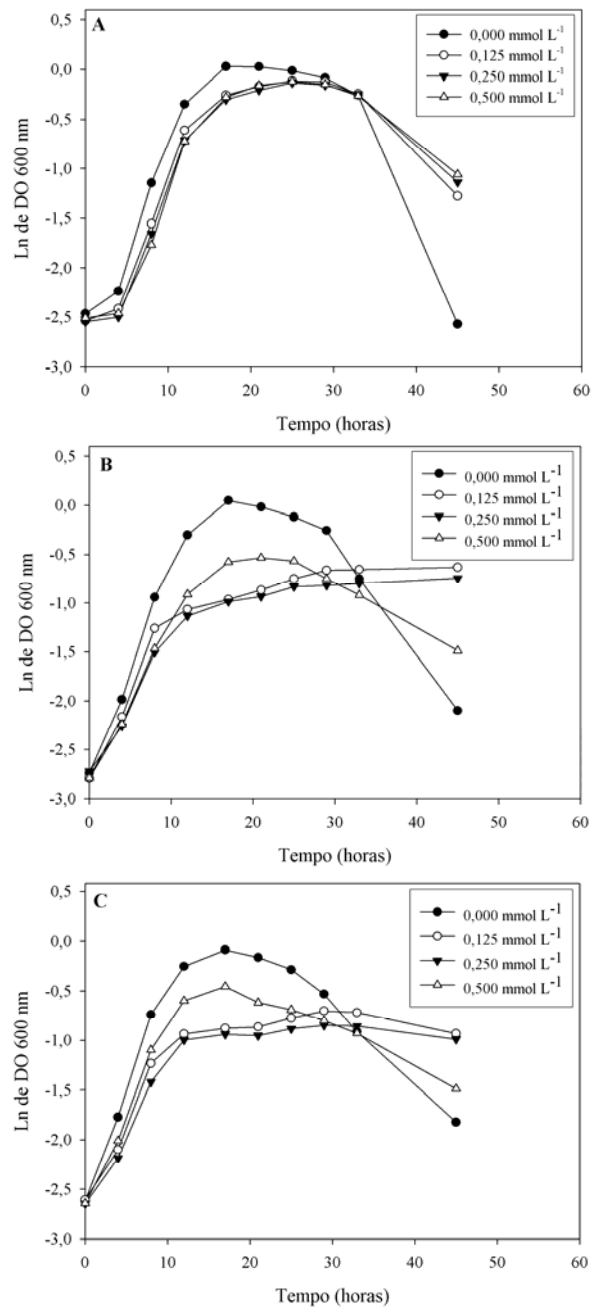


Figura 2 - Crescimento anaeróbico dos isolados de *Bacillus* LBBMA111A (A), LBBMA155 (B) e LBBMA283 (C) em meio MM reduzido com ditioneitol nas concentrações de 0, 0,125, 0,25 e 0,5 mmol L<sup>-1</sup>. Os isolados foram crescidos em anaerobiose em meio MM suplementado com glicose e proteose peptona, ambos a 30 g L<sup>-1</sup> por 30 horas a 30° C. Após esse período as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes em salina 8,5 g L<sup>-1</sup>. As células foram introduzidas em câmara anaeróbia, ressuspendidas em salina anaeróbia 8,5 g L<sup>-1</sup> e inoculadas em meio MM anaeróbico, contendo os tratamentos descritos acima, de modo a se obter uma DO<sub>600</sub> inicial de 0,1.

por mol de ATP. Os autores ressaltam ainda que a reorientação dos fluxos catabólicos e anabólicos garantem a otimização do crescimento de *B. cereus* em baixos potenciais redox, e que tal capacidade requer uma regulação eficiente do metabolismo. Dos três isolados pesquisados neste estudo, somente o LBBMA111A apresentou pouca variação em seu crescimento em resposta à redução do potencial redox e parece ser o isolado mais adaptado a esta condição.

O isolado LBBMA155 apresentou maior  $DO_{600}$  máxima em todos os tratamentos com redutor quando crescido em meio MM suplementado com DNA, em comparação ao seu crescimento em meio MM não-suplementado (Tabela 2). O maior crescimento foi obtido no meio de cultura sem redutor, no qual a  $DO_{600}$  máxima foi cerca de 2 vezes superior à obtida nos demais tratamentos. As concentrações intermediárias de redutor proporcionaram crescimento semelhante à bactéria, sendo que nesses dois tratamentos a  $DO_{600}$  máxima atingida foi superior à máxima obtida no tratamento com  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  (Figura 3A e Tabela 2). Em nenhum dos tratamentos foi observada fase de morte ou formação de endósporos (Figura 3A). O maior crescimento do isolado LBBMA155, assim como a ausência de uma fase de declínio em meio MM suplementado com DNA, em todas as concentrações de redutor, indicam ser este o principal fator limitante ao seu crescimento em condição de baixo potencial redox.

Foi observada a ocorrência de um padrão de crescimento semelhante à diauxia em todos os potenciais redox avaliados, em meio suplementado com DNA (Figura 3A). Em meio de cultura não-suplementado, esse padrão foi observado somente nas concentrações intermediárias do agente redutor, tanto com o isolado LBBMA 155 quanto com o isolado LBBMA 283 (Figuras 2B e 2C). Apesar do meio MM possuir extrato de levedura a  $1 \text{ g L}^{-1}$ , a sua utilização como fonte secundária de carbono ou energia deveria ocorrer somente após o consumo de toda a glicose presente no meio. Essa transição do uso da glicose para o dos componentes do extrato de levedura parece ser improvável, uma vez que alterações da taxa de crescimento foram observadas em concentrações celulares correspondentes a valores de  $DO_{600}$  relativamente baixos (Figuras 2B, 2C e 3A). Esses resultados fazem supor que a concentração de glicose residual no meio de cultura deveria ainda sustentar o crescimento microbiano. Uma outra explicação para o fenômeno pode envolver a formação de endósporos, acompanhada de uma volta ao estado vegetativo e retomada do crescimento. Desta forma, mais estudos devem ser feitos com o intuito de revelar quais as implicações de baixos potenciais redox no metabolismo anaeróbio dessas espécies de *Bacillus*.

Tabela 2 – Densidade ótica ( $DO_{600}$ ) máxima atingida pela cultura de três isolados de *Bacillus* em função da concentração de redutor no meio de cultura, sendo este suplementado ou não com DNA a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Os dados abaixo representam a média de três repetições

<b>Isolado</b>			
	LBBMA155	LBBMA111A	LBBMA283
<b>Com DNA</b>			
Concentração de redutor (mM)	Densidade Ótica 600 nm		
0,500	1,010	0,742	0,961
0,250	1,296	0,668	0,427
0,125	1,337	0,879	0,663
0,000	1,955	0,891	1,200
<b>Sem DNA</b>			
0,500	0,586	0,886	0,636
0,250	0,474	0,877	0,429
0,125	0,530	0,892	0,495
0,000	1,050	1,030	0,917

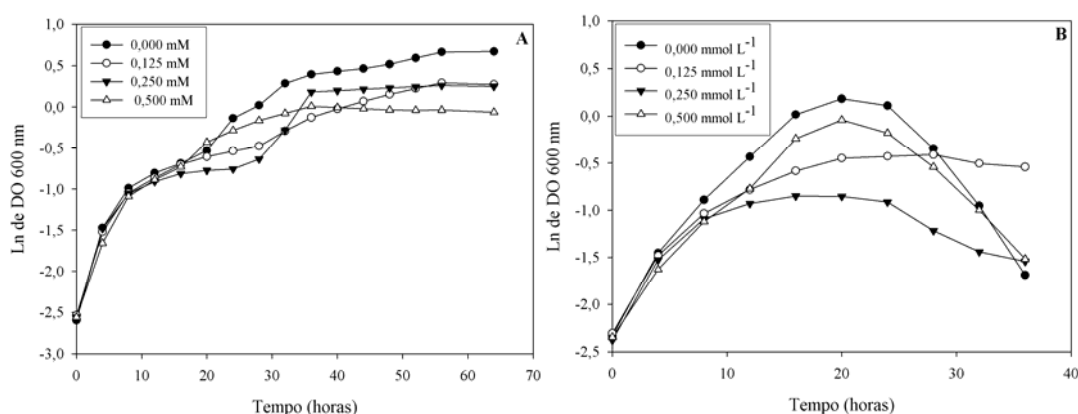


Figura 3 - Crescimento anaeróbico dos isolados de *Bacillus* LBBMA155 (A) e LBBMA283 (B) em meio MM reduzido com ditiotreitól nas concentrações de 0, 0,125, 0,25 e 0,5  $\text{mmol L}^{-1}$  e suplementado com DNA a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Os isolados foram crescidos em anaerobiose em meio MM suplementado com glicose e proteose peptona, ambos a  $30 \text{ g L}^{-1}$  por 30 horas a  $30^\circ \text{ C}$ . Após esse período as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes em salina  $8,5 \text{ g L}^{-1}$ . As células foram introduzidas em câmara anaeróbica, ressuspendidas em salina anaeróbica  $8,5 \text{ g L}^{-1}$  e inoculadas em meio MM anaeróbico, contendo os tratamentos descritos acima, de modo a se obter uma  $DO_{600}$  inicial de 0,1.

O isolado LBBMA283 apresentou melhor crescimento em meio MM suplementado com DNA, em comparação com o seu crescimento em meio MM não-suplementado (Tabela 2). Esse comportamento foi observado em todos os tratamentos com ditiotreitol. Assim como o observado no meio não-suplementado, as concentrações intermediárias de redutor foram as mais restritivas ao crescimento (Figura 3B e Tabela 2). O melhor crescimento do isolado LBBMA283 em meio MM suplementado com DNA indica que a deficiência na síntese dessa molécula - ou dos desoxirribonucleotídeos que a constituem - é um dos fatores limitantes para o crescimento do isolado, como também observado para o isolado LBBMA155. No entanto, outros fatores parecem afetar o crescimento da bactéria, principalmente nos potenciais redox intermediários avaliados. Estudos mais aprofundados devem ser conduzidos para explicar que tipo de alteração metabólica pode levar a esse comportamento.

Além de serem capazes de crescer sob condições adversas, as espécies do gênero *Bacillus* são conhecidas pela capacidade de crescer e produzir biossurfactantes em condição anaeróbia. Dentre essas espécies destacam-se *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mojavensis* e *Bacillus subtilis* (Javaheri *et al.*, 1985; Yakimov *et al.*, 1995; Yakimov *et al.*, 1997; Davis *et al.*, 1999; Youssef *et al.*, 2006; Soudmand-asli *et al.*, 2007). Neste trabalho, os três isolados de *Bacillus* estudados foram capazes de produzir biossurfactantes em condição anaeróbia. A produção dessas moléculas demonstrou ser influenciada de forma diferente pela concentração do agente redutor no meio, para cada isolado.

Os valores de tensão interfacial líquido-ar obtidos com o extrato da cultura do isolado LBBMA155 em meio MM, tanto na presença quanto na ausência de DNA, em função do potencial redox, se enquadram significativamente ( $P < 0,01$ ) em um modelo quadrático de regressão (Figuras 4A e 4B). Os menores valores de tensão foram obtidos nas concentrações de 0 e 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de redutor, e praticamente não diferiram quando a bactéria foi crescida em meio MM com ou sem DNA (Tabela 3).

A diluição micelar crítica (DMC) das culturas do isolado LBBMA155 ficou acima de 2,5, o que significa que a concentração de biossurfactantes, nesses extratos, correspondia a no mínimo duas vezes e meia (2,5X) a sua concentração micelar crítica (CMC) (Tabela 4). Normalmente, a produção de biossurfactantes como a surfactina, produzida por *B. subtilis*, está diretamente ligada à densidade populacional da cultura (Sullivan, 1998). Neste experimento, porém, demonstrou-se que o potencial redox é

capaz de interferir nessa relação entre crescimento e produção de biossurfactantes. O isolado LBBMA155 apresentou melhor crescimento em meio MM + DNA sem redutor, quando comparado aos demais tratamentos. Neste tratamento, também obteve-se produção de biossurfactantes em uma maior concentração, com DMC de aproximadamente 3,8 (Tabela 4). Quando este isolado foi crescido em meio MM + DNA com 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de redutor, apresentou DO<sub>600</sub> máxima aproximadamente 2,5 vezes menor do que a DO<sub>600</sub> máxima obtida no tratamento sem redutor (Tabela 2), e uma DMC da cultura de aproximadamente 3,6, resultado muito próximo ao obtido quando o isolado foi crescido em meio MM + DNA sem redutor (Tabela 4). A alteração da relação direta entre crescimento e produção de biossurfactantes fica ainda mais evidente quando se analisa a produção dessas moléculas pelo isolado LBBMA155 crescido em meio MM sem DNA. A DMC da cultura foi de aproximadamente 3,1 quando o isolado foi crescido em meio MM com 0,5 ou 0,125 mmol L<sup>-1</sup> de redutor, valor inferior ao obtido em meio MM sem redutor (Tabela 4). No entanto, o isolado apresentou crescimento cerca de 50% menor nos tratamentos com 0,5 ou 0,125 mmol L<sup>-1</sup> de redutor, em comparação ao tratamento sem redutor.

Além de promover alterações na quantidade de biossurfactantes produzidos, o potencial redox parece influenciar também a estrutura química das moléculas sintetizadas. O crescimento do isolado LBBMA155 em meio MM, em todos os tratamentos com redutor, na presença e ausência de DNA, proporcionou a produção de biossurfactantes em concentrações superiores a 2,5X a diluição micelar crítica (Tabela 4). Porém, esses biossurfactantes não possuem a mesma eficiência na redução da tensão interfacial ar-líquido, mesmo estando em concentrações semelhantes. Os biossurfactantes produzidos em meio MM com ou sem DNA e reduzido com 0,125 ou 0,25 mmol L<sup>-1</sup> de ditioneitol, são menos eficazes na redução da tensão interfacial (Tabela 3).

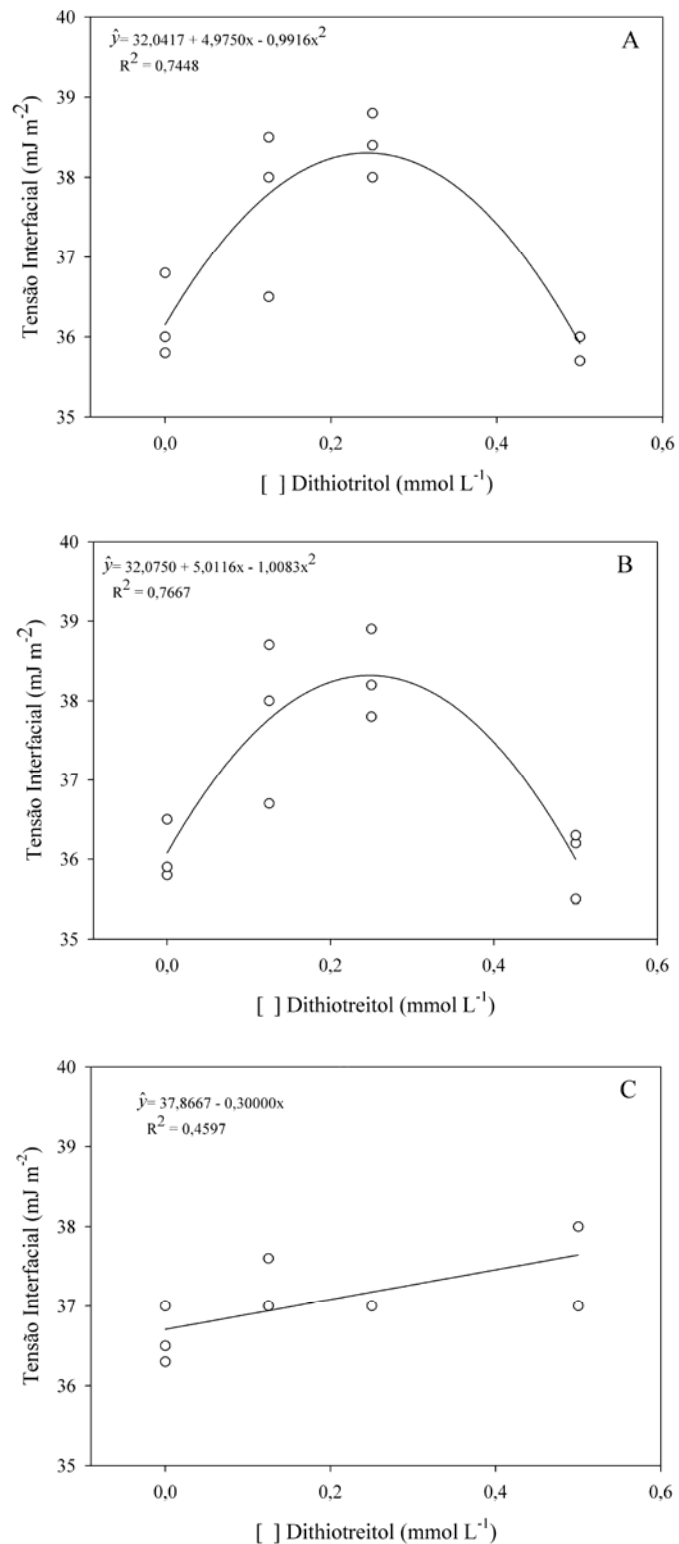


Figura 4 - Modelos de regressão para a redução da tensão interfacial ar-líquido pelos isolados de *Bacillus*. (A) LBBMA155 em meio suplementado com DNA; (B) LBBMA155 em meio não-suplementado com DNA; (C) LBBMA111A em meio não-suplementado.

A hipótese de que o crescimento do isolado LBBMA155 em diferentes potenciais redox provoca alterações na estrutura química das moléculas de biossurfactantes produzidas é reforçada pelos valores de índices de emulsificação das culturas. As culturas obtidas em meio MM com e sem DNA e nas concentrações intermediárias do agente redutor (0,125 e 0,25 mmol L<sup>-1</sup> de ditiotreititol), produziram menor emulsificação inicial, sendo essas emulsões poucos estáveis quanto comparadas com as emulsões formadas com as culturas dos demais tratamentos (Tabela 5). Esses dados podem indicar menor afinidade dos biossurfactantes produzidos pelo querosene utilizado na avaliação da capacidade de emulsificação, em comparação aos produzidos durante o crescimento em meio MM contendo 0 e 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de redutor. Análises estruturais devem ser procedidas com o intuito de validar essa hipótese.

Os valores de tensão ar-líquido nas culturas do isolado LBBMA111A foram diretamente proporcionais à concentração do agente redutor no meio de cultura, tendo variado entre 36,6 a 37,7 mJ m<sup>-2</sup> (Tabela 3). A redução da tensão interfacial pelos biossurfactantes produzidos durante o crescimento do isolado LBBMA111A, nas diferentes concentrações de redutor, foi explicada de maneira significativa por um modelo de regressão linear ( $P = 0,0154$ ) (Figura 4C). Pode-se concluir, portanto, que os biossurfactantes produzidos pelo isolado em meio de cultura com baixo potencial redox apresentam menor atividade de redução da tensão interfacial ar-líquido. Os dados de DMC indicam uma queda na produção de biossurfactantes somente no tratamento com 0,125 mmol L<sup>-1</sup> de redutor, tratamento em que a cultura apresentou uma DMC em torno de 2,2. As culturas dos demais tratamentos apresentaram concentrações de biossurfactantes no mínimo 3X superiores à concentração micelar crítica (Tabela 4). Os dados que confirmam produção satisfatória de biossurfactantes (concentração acima da CMC) pelo isolado LBBMA111A em todos os tratamentos com redutor, juntamente com os que demonstram alteração da atividade desses biossurfactantes em resposta à concentração do agente redutor no meio de crescimento, são indícios de que a composição dos biossurfactantes é modificada em função do potencial redox, à semelhança do ocorrido com o isolado LBBMA155.



Tabela 3 - Tensão interfacial ( $\text{mJ m}^{-2}$ ) ar-líquido medida na cultura de três isolados de *Bacillus* em função da concentração do agente redutor ditiotreitól no meio de cultura. Os dados abaixo representam a média de três repetições

Concentração de ditiotreitól ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	Isolado		
	LBBMA155	LBBMA111A	LBBMA283
	Meio mineral MM		
	Tensão interfacial	Tensão interfacial	Tensão interfacial
0,500	35,9	37,7	35,7
0,250	38,4	37,0	37,5
0,125	37,7	37,2	36,8
0,000	36,2	36,6	36,2
Meio mineral MM + DNA			
0,500	36,0	ND	35,6
0,250	38,3	ND	37,7
0,125	37,8	ND	36,9
0,000	36,1	ND	36,7

\* ND – Não determinado

Tabela 4 - Diluição micelar crítica (DMC) das culturas de três isolados de *Bacillus* em função da concentração do agente redutor ditiotreitól no meio de cultura. Os dados abaixo representam a média de três repetições

Concentração de ditiotreitól ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	Isolado		
	LBBMA155	LBBMA111A	LBBMA283
	Meio mineral MM		
	DMC	DMC	DMC
0,500	3,15	3,00	3,00
0,250	2,60	3,00	1,70
0,125	3,15	2,22	2,22
0,000	3,00	3,15	2,50
Meio mineral MM + DNA			
0,500	3,52	ND	3,15
0,250	2,85	ND	2,22
0,125	3,00	ND	2,50
0,000	3,74	ND	2,72

Os biossurfactantes produzidos pelo isolado LBBMA111A proporcionaram a obtenção de valores elevados de emulsificação inicial e a formação de emulsões com querosene com elevada estabilidade (Tabela 5). Assim como foi constatado para a tensão interfacial, os melhores resultados de emulsificação foram obtidos no tratamento sem redutor, com 70% de emulsificação inicial e mais de 80% de estabilidade. O menor valor de emulsificação inicial (cerca de 56%) foi obtido com o extrato da cultura no meio contendo  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de redutor. Contudo, não foi observado efeito expressivo da concentração do agente redutor na estabilidade das emulsões (Tabela 5). A concordância dos dados apresentados reforça a hipótese de que o baixo potencial reduz a atividade dos biossurfactantes produzidos pelo isolado LBBMA111A em meio MM, sendo isso apontado tanto pela menor eficiência na redução da tensão interfacial ar-líquido quanto pelo menor índice de emulsificação obtida com o querosene.

Nenhum modelo de regressão pôde explicar a influência da concentração do agente redutor na redução da tensão interfacial pelos biossurfactantes produzidos pelo isolado LBBMA283 crescido em meio MM, tanto na presença quanto na ausência de DNA. As tensões interfaciais ar-líquido variaram em torno de uma média de  $36,72 \text{ mJ m}^{-2}$  em meio MM suplementado com DNA e de  $36,57 \text{ mJ m}^{-2}$  no meio MM sem DNA (Tabela 3). A eficiência na redução da tensão interfacial ar-líquido dos biossurfactantes produzidos pelo isolado LBBMA283 crescido em meio MM, na presença ou ausência de DNA, foi influenciada pela concentração de redutor adicionada ao meio. Os surfactantes produzidos durante o crescimento do isolado LBBMA283 em meio MM contendo  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  do redutor foram os que propiciaram os menores valores de tensão interfacial (Tabela 3).

Maiores concentrações de biossurfactantes, expressas como maior DMC, foram obtidas quando o isolado foi crescido em meio MM contendo  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de redutor (Tabela 4). Esses dados sugerem que o potencial redox obtido com a adição de  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de ditionitrito estimula a produção de biossurfactantes pelo isolado LBBMA283. A suplementação do meio de crescimento com DNA resultou em maior produção de biossurfactantes, independentemente da concentração do agente redutor (Tabela 4). Esse fato é atribuído ao melhor crescimento do isolado LBBMA283 em meio MM na presença de DNA (Figura 3B e Tabela 2), comparativamente ao obtido em meio MM sem suplementação (Figura 2C e Tabela 2).

As emulsões formadas entre as culturas do isolado LBMA 283 em meio MM contendo as concentrações intermediárias do agente redutor ( $0,125$  e  $0,250 \text{ mmol L}^{-1}$ )

apresentaram baixa estabilidade, assim como também observado com o isolado LBBMA 155 (Tabela 5). Novamente, esse comportamento é indicativo de mudança estrutural dos tipos de biossurfactantes produzidos em diferentes condições de potencial redox. Essas mudanças, juntamente com alterações do comportamento termodinâmico dos biossurfactantes (expressas como mudança de atividade e de comportamento das emulsões formadas com o querosene), podem ter implicações significativas na eficiência desses compostos durante as operações de recuperação de óleo, e devem ser investigadas em maior detalhe. Adicionalmente, uma maior compreensão de como o potencial redox do meio de crescimento afeta o comportamento termodinâmico dos biossurfactantes produzidos pode ser aplicada à obtenção de moléculas com características úteis em diferentes campos de aplicação desses compostos.

Tabela 5 - Índice de emulsificação inicial (EI, %) e estabilidade da emulsão após 24 horas (E24), expressa como porcentagem da EI, formada entre o querosene e a cultura de três isolados de *Bacillus* crescidos em meio MM contendo diferentes concentrações do agente redutor ditiotreitól. Os dados abaixo representam a média de três repetições

Concentração de ditiotreitól (mmol L <sup>-1</sup> )	Isolado					
	LBBMA155		LBBMA111A		LBBMA283	
	EI	E24	EI	E24	EI	E24
<b>Meio mineral MM</b>						
0,500	62,5	75,3	56,7	78,0	65,0	74,4
0,250	32,9	0	65,0	82,1	42,1	6,0
0,125	37,5	0	64,2	76,7	38,3	6,5
0,000	66,7	72,5	70,0	82,2	68,3	76,9
<b>Meio mineral MM + DNA</b>						
0,500	62,1	75,2	ND	ND	67,5	75,2
0,250	35,0	6,1	ND	ND	42,9	12,6
0,125	38,7	5,3	ND	ND	38,7	6,5
0,000	68,7	72,8	ND	ND	67,1	79,2

\* ND – Não determinado

### **4.3. Influência das fontes de carbono e de nitrogênio no crescimento dos isolados e na produção de biossurfactantes**

O crescimento anaeróbio dos isolados de *Bacillus* foi influenciado significativamente tanto pelas fontes de carbono quanto pelas de nitrogênio presentes no meio de cultura.

O isolado LBBMA155 foi capaz de crescer anaerobicamente utilizando todas as fontes de nitrogênio testadas. Quanto às fontes de carbono, o isolado mostrou ser incapaz de utilizar o amido e pouco eficiente na utilização do piruvato de sódio, alcançando valor máximo de DO<sub>600</sub> inferior a 0,2 na presença dessa fonte de carbono (Figura 5 e Tabela 6). Em um estudo que visou comparar o metabolismo anaeróbio de três microrganismos, Clements *et. al.* (2002) reportaram que o isolado *Bacillus subtilis* LCB6 não apresentou crescimento anaeróbio na presença de piruvato como fonte de carbono e que o isolado *Bacillus licheniformis* BG188 apresentou baixo crescimento ao utilizar essa fonte de carbono, com DO<sub>600</sub> máxima de 0,25. A suplementação do meio MM com amido como única fonte de carbono não foi capaz de sustentar o crescimento anaeróbio do isolado LBBMA155 neste experimento; no entanto, a utilização desse substrato como fonte de carbono por bactérias do gênero *Bacillus*, crescendo sob metabolismo aeróbio, é reportada na literatura (Mukherjee e Das, 2005).

A proteose peptona foi a fonte de nitrogênio que proporcionou o melhor crescimento do isolado LBBMA155, independentemente da fonte de carbono utilizada (Figuras 5A e 5B e Tabela 6). Dentre as fontes de carbono, a sacarose proporcionou os melhores resultados de crescimento, independentemente da fonte de nitrogênio utilizada (Figura 5B e Tabela 6). O isolado apresentou baixo crescimento na presença de glicose quando o meio MM foi suplementado com extrato de levedura a 0,1 g L<sup>-1</sup> (Figura 5A e Tabela 6), em comparação com o crescimento obtido em meio MM suplementado com igual concentração de glicose e maior concentração (1 g L<sup>-1</sup>) de extrato de levedura (Figura 3A e Tabela 2). Esses resultados indicam que algum fator de crescimento presente no extrato de levedura é requerido pela bactéria em uma concentração maior do que a fornecida neste experimento, quando glicose é utilizada como fonte de carbono. O fator de crescimento referido provavelmente não é um aminoácido, já que a proteose peptona não foi capaz de substituir o extrato de levedura (Figura 5A), nem tampouco desoxirribonucleotídeos, uma vez que o meio de cultura foi suplementado com DNA.

Tabela 6 – Densidade ótica ( $DO_{600}$ ) máxima atingida pela cultura de três isolados de *Bacillus* em função de dois tratamentos com carbono e três tratamentos com nitrogênio, montados em um fatorial (2x3), com três repetições. Os dados apresentados representam a média das repetições

<b>Densidade Ótica 600 nm</b>			
<b>LBBMA155</b>			
<b>Nitrogênio</b>			
<b>Carbono</b>	<b>Nitrato de sódio</b>	<b>Sulfato de amônio</b>	<b>Proteose peptona</b>
<b>Sacarose</b>	1,035	0,624	1,330
<b>Glicose</b>	0,586	0,559	0,831
<b>LBBMA111A</b>			
<b>Sacarose</b>	0,757	0,538	1,500
<b>Glicose</b>	0,371	0,446	0,639
<b>LBBMA283</b>			
<b>Sacarose</b>	0,714	0,569	0,744
<b>Glicose</b>	0,355	0,437	0,619

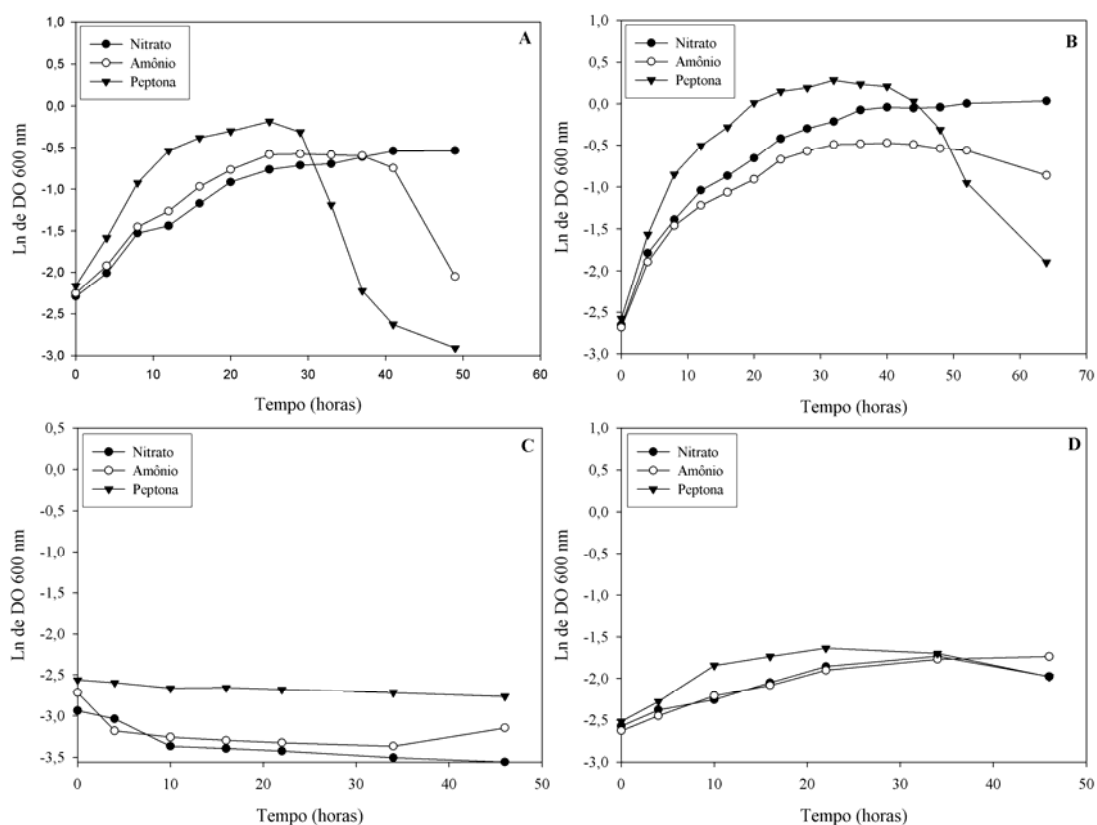


Figura 5 - Crescimento anaeróbico do isolado LBBMA155 em meio MM contendo 0,1 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, suplementado com DNA a 10 mg L<sup>-1</sup>, com três fontes distintas de nitrogênio e (A) 30 g L<sup>-1</sup> de glicose; (B) 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose; (C) 10 g L<sup>-1</sup> de amido e (D) 20 g L<sup>-1</sup> de piruvato de sódio. Os isolados foram crescidos em anaerobiose em meio MM suplementado com glicose e proteose peptona, ambos a 30 g L<sup>-1</sup>, por 30 horas a 30° C. Após esse período, as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes em salina a 8,5 g L<sup>-1</sup>. As células foram introduzidas em câmara anaeróbia, ressuspensas em salina anaeróbia a 8,5 g L<sup>-1</sup> e inoculadas em meio MM anaeróbico, contendo os tratamentos descritos acima, de modo a se obter uma DO<sub>600</sub> inicial de 0,1.

O isolado LBBMA111A também foi capaz de utilizar todas as fontes de nitrogênio testadas. Assim como o relatado para o isolado LBBMA155, o isolado LBBMA 111A não apresentou crescimento na presença de amido. Piruvato de sódio proporcionou baixo crescimento ao isolado, com  $DO_{600}$  máxima inferior a 0,2 (tabela 6). A proteose peptona foi a fonte de nitrogênio que proporcionou melhor crescimento do isolado, independentemente da fonte de carbono utilizada (Figura 6 e Tabela 6). A eficiência das fontes inorgânicas de nitrogênio em sustentar o crescimento variou conforme a fonte de carbono utilizada. Em meio contendo glicose, o amônio propiciou melhor crescimento do que o nitrato; o inverso foi observado quando sacarose foi utilizada como fonte de carbono (Figuras 6A, 6B e Tabela 6). O isolado LBBMA111A apresentou melhor crescimento quando sacarose foi utilizada como fonte de carbono. Em meio contendo essa fonte de carbono, a  $DO_{600}$  máxima foi de 1,5 quando proteose peptona foi utilizada como fonte de nitrogênio (Tabela 6). Assim como descrito anteriormente para o isolado LBBMA155, o crescimento do isolado quando glicose é utilizada como fonte de carbono parece estar condicionado à presença de extrato de levedura em maiores concentrações. Quando o meio MM foi suplementado com extrato de levedura a  $1 \text{ g L}^{-1}$ , tendo como fonte de nitrogênio o amônio, obteve-se crescimento da bactéria equivalente a uma  $DO_{600}$  máxima de 1,0 (Tabela 2). Em meio MM suplementado com extrato de levedura a  $0,1 \text{ g L}^{-1}$ , a  $DO_{600}$  máxima foi de 0,63, quando a proteose peptona foi utilizada como fonte de nitrogênio, e de apenas 0,44 quando essa fonte foi o amônio (Tabela 6).

O isolado LBBMA283 não apresentou crescimento na presença de amido (Figura 7C), à semelhança dos outros dois isolados. O crescimento do isolado na presença de piruvato de sódio como única fonte de carbono foi baixo, condição em que a  $DO_{600}$  máxima foi inferior a 0,2 (Tabela 6). Assim como também relatado para os demais isolados, o melhor crescimento do isolado LBBMA283 foi obtido no tratamento com sacarose como fonte de carbono, onde a proteose peptona e o nitrato apresentaram-se como as melhores fontes de nitrogênio (Figura 7B e Tabela 6). Os resultados apresentados pela literatura envolvendo o crescimento aeróbio de *B. subtilis* também apontam a sacarose como melhor fonte de carbono para o crescimento bacteriano, com formação de 40% a mais de biomassa comparado aos dados obtidos com glicose (Makkar e Cameotra, 1997). No tratamento com glicose, o isolado apresentou melhor crescimento quando a proteose peptona foi utilizada como fonte de nitrogênio. Quando se utilizou amônio ou nitrato, as  $DO_{600}$  máximas foram de 0,43 e 0,35, respectivamente

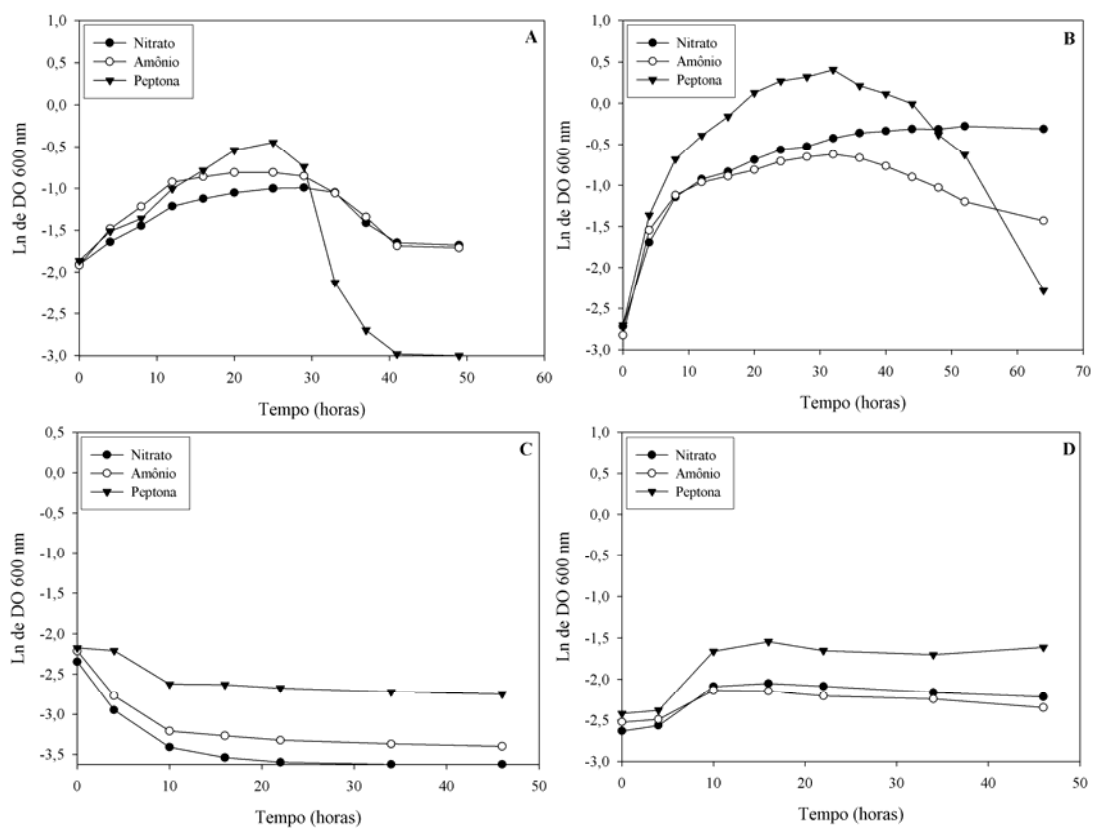


Figura 6 - Crescimento anaeróbio do isolado LBBMA111A em meio MM contendo  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura, suplementado com DNA a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , três fontes distintas de nitrogênio e (A)  $30 \text{ g L}^{-1}$  de glicose; (B)  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose; (C)  $10 \text{ g L}^{-1}$  de amido e (D)  $20 \text{ g L}^{-1}$  de piruvato de sódio. Os isolados foram crescidos em anaerobiose em meio MM suplementado com glicose e proteose peptona, ambos a  $30 \text{ g L}^{-1}$  por 30 horas a  $30^\circ \text{ C}$ . Após esse período as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes em salina a  $8,5 \text{ g L}^{-1}$ . As células foram introduzidas em câmara anaeróbia, ressuspensas em salina anaeróbia a  $8,5 \text{ g L}^{-1}$  e inoculadas em meio MM anaeróbio, contendo os tratamentos descritos acima, de modo a se obter uma  $\text{DO}_{600}$  inicial de  $0,1$ .



(Tabela 6). Semelhantemente ao que foi descrito para os isolados LBBMA155 e LBBMA111A, o isolado LBBMA283 apresentou baixo crescimento na presença de glicose quando o meio MM foi suplementado com  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura (Figura 7A e Tabela 6), em comparação ao crescimento observado no experimento em meio MM suplementado com  $1 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura (Figura 2C e Tabela 2). Isso reforça a hipótese da existência de um fator essencial ao crescimento dos três isolados no extrato de levedura, quando glicose é a única fonte de carbono, e de que possivelmente esse fator não seja um aminoácido, uma vez que a adição de outra fonte de aminoácidos (proteose peptona) não eliminou a restrição ao crescimento resultante da diminuição da concentração de extrato de levedura (Figuras 5A, 6A e 7A). Javaheri et. al.(1985) também reportam o requerimento de extrato de levedura a  $1 \text{ g L}^{-1}$  para o crescimento anaeróbico do isolado *B. licheniformis* JF-2 em meio E, o que indica que esse tipo de deficiência nutricional não é um fato raro em espécies do gênero *Bacillus* crescendo em anaerobiose.

Além de influenciarem diferentemente o crescimento das bactérias, as modificações de fontes de carbono e de nitrogênio também influenciaram a concentração e a atividade dos biossurfactantes produzidos (Tabela 7).

A redução da tensão interfacial ar-líquido nas culturas do isolado LBBMA155 demonstrou ser influenciada significativamente tanto por variações na fonte de carbono ( $P = 0,0393$ ) quanto na de nitrogênio ( $P = 0,0001$ ) (Tabela 7). No entanto, esses fatores atuaram de maneira independente, já que não ocorreu interação significativa entre eles. A sacarose foi a fonte de carbono que proporcionou o maior abaixamento da tensão interfacial para esse isolado, com média geral de  $39,32 \text{ mJ m}^{-2}$  (Tabela 7). No entanto, valores de tensão com média abaixo de  $35 \text{ mJ m}^{-2}$  foram obtidos quando ambas as fontes de carbono foram utilizadas na presença de proteose peptona como fonte de nitrogênio. Os dados apresentados na Tabela 4 mostram que a proteose peptona foi a fonte de nitrogênio que propiciou a obtenção de biossurfactantes com maior atividade, retratada pelo valor de tensão interfacial significativamente menor do que a encontrada nos extratos obtidos em meio MM suplementado com amônio ou nitrato.

Além de propiciar a obtenção de biossurfactantes com maior atividade, a utilização da proteose peptona no meio de crescimento do isolado LBBMA 155 resultou em extratos com maior concentração de biossurfactantes (Tabela 8). No meio contendo glicose, obteve-se um valor de DMC de 3,0, o que indica a presença de biossurfactantes

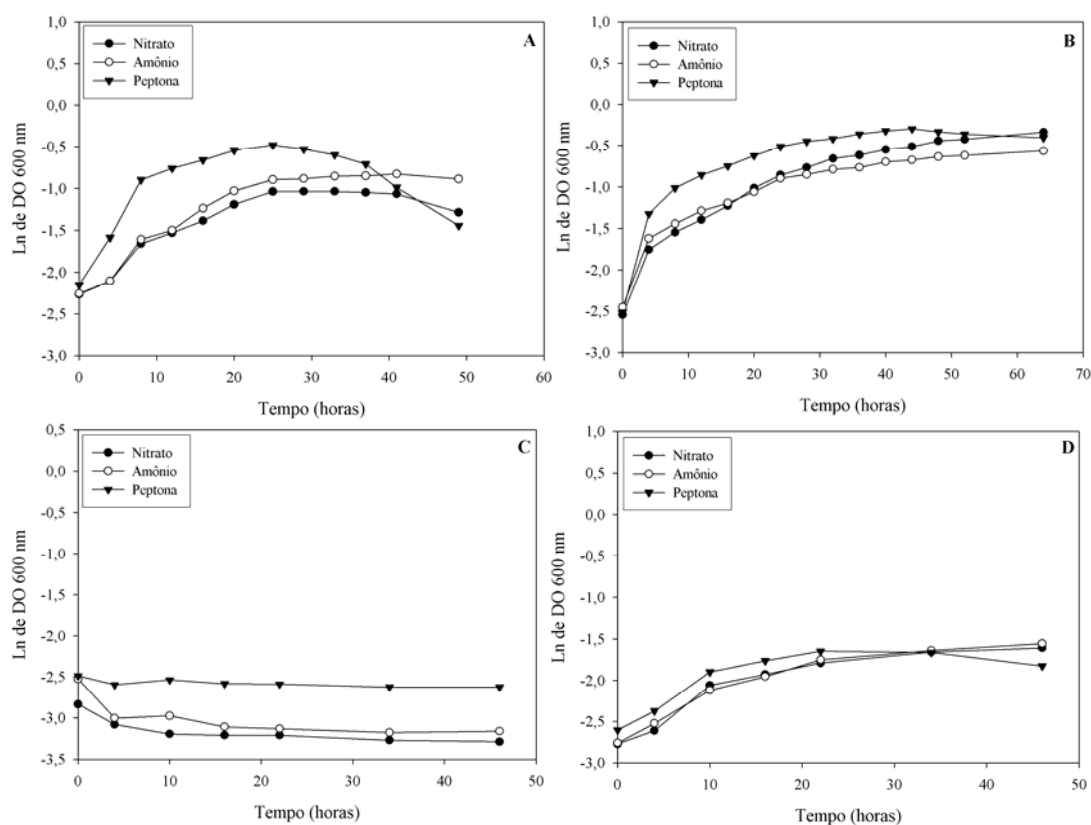


Figura 7 - Crescimento anaeróbico do isolado LBBMA283 em meio MM contendo 0,1 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, suplementado com a 10 mg L<sup>-1</sup>, três fontes distintas de nitrogênio e (A) 30 g L<sup>-1</sup> de glicose; (B) 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose; (C) 10 g L<sup>-1</sup> de amido e (D) 20 g L<sup>-1</sup> de piruvato de sódio. Os isolados foram crescidos em anaerobiose em meio MM suplementado com glicose e proteose peptona, ambos a 30 g L<sup>-1</sup> por 30 horas a 30° C. Após esse período as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes em salina a 8,5 g L<sup>-1</sup>. As células foram introduzidas em câmara anaeróbica, ressuspensas em salina anaeróbica a 8,5 g L<sup>-1</sup> e inoculadas em meio MM anaeróbico, contendo os tratamentos descritos acima, de modo a se obter uma DO<sub>600</sub> inicial de 0,1.

em uma concentração 3X superior à concentração micelar crítica. Já no tratamento com sacarose, a DMC foi um pouco inferior a 5,0 (Tabela 8). O nitrato foi a segunda melhor fonte de nitrogênio para ambas as fontes de carbono, propiciando, porém, valor de DMC inferior a 1,2 quando combinado com glicose e a 2,2 quando se utilizou a sacarose como fonte de carbono (Tabela 8). Ressalta-se que o elevado crescimento do isolado LBBMA 155 em meio MM com nitrato e sacarose (Figura 5B) não foi traduzido em elevada produção de biossurfactantes (Tabela 8). Aparentemente, a produção de biossurfactantes em concentrações elevadas pelo isolado LBBMA155, em meio anaeróbico, está ligada à presença de uma fonte orgânica de nitrogênio. No experimento anterior, extrato de levedura a 1 g L<sup>-1</sup> também proporcionou a produção de biossurfactantes capazes de reduzir a tensão interfacial para valores de 36,2 mJ m<sup>-2</sup> (Tabela 3), em concentração equivalente a uma DMC próxima de 3 (Tabela 4). Esse mesmo comportamento foi descrito por Kim et al. (1997), onde a produção em aerobiose do biossurfactante C9-BS em altas concentração pelo isolado *B. subtilis* C9 mostrou ser vinculada à presença de uma fonte orgânica de nitrogênio, sendo naquele caso extrato de levedura a 0,5 g L<sup>-1</sup>.

Tabela 7 - Tensão interfacial ar-líquido medida nas culturas de três isolados de *Bacillus* em resposta a variações nas fontes de carbono e de nitrogênio. Os valores representam a média de três repetições

Tratamentos	Isolado	
	LBBMA111A	LBBMA155
<b>Carbono</b>		
<b>Glicose</b>	40,05 A	42,45 A
<b>Sacarose</b>	38,96 B	39,32 B
<b>Nitrogênio</b>		
<b>Nitrato de sódio</b>	39,03 A	42,38 A
<b>Sulfato de amônio</b>	39,88 A	45,61 A
<b>Proteose peptona</b>	40,13 A	34,66 B

- Valores pertencentes aos tratamentos com carbono ou nitrogênio presentes na mesma coluna e seguidos de mesma letra não diferem entre si, a 5% de probabilidade.

Tabela 8 - Diluição micelar crítica (DMC) das culturas de três isolados de *Bacillus* em resposta a variações nas fontes de carbono e de nitrogênio. Os valores representam a média de três repetições

<b>Isolado LBBMA155</b>			
<b>Fonte de Nitrogênio</b>			
	<b>Nitrato de sódio</b>	<b>Sulfato de amônio</b>	<b>Proteose peptona</b>
<b>Fonte de Carbono</b>	<b>DMC</b>	<b>DMC</b>	<b>DMC</b>
<b>Glicose</b>	1,15	1,00	3,00
<b>Sacarose</b>	2,14	1,00	4,61
<b>Isolado LBBMA111A</b>			
<b>Glicose</b>	1,67	1,67	1,15
<b>Sacarose</b>	1,67	1,36	1,67
<b>Isolado LBBMA283</b>			
<b>Glicose</b>	1,15	1,00	2,72
<b>Sacarose</b>	1,00	1,00	1,00

Tabela 9 - Emulsificação inicial e índice de emulsificação E24 (%) para as culturas de três isolados de *Bacillus* em resposta a variações nas fontes de carbono e de nitrogênio. Os valores representam a média de três repetições

<b>Isolado LBBMA155</b>						
<b>Fonte de Nitrogênio</b>						
	<b>Nitrato de sódio</b>		<b>Sulfato de amônio</b>		<b>Proteose peptona</b>	
<b>Fonte de Carbono</b>	<b>Emulsificação</b>		<b>Emulsificação</b>		<b>Emulsificação</b>	
	<b>Inicial (%)</b>	<b>E24</b>	<b>Inicial (%)</b>	<b>E24</b>	<b>Inicial (%)</b>	<b>E24</b>
<b>Glicose</b>	36,3	7,9	42,9	47,5	57,5	5,3
<b>Sacarose</b>	52,5	74,4	50,4	54,3	38,3	13,2
<b>Isolado LBBMA111A</b>						
<b>Glicose</b>	45,0	65,6	42,5	28,3	47,9	21,8
<b>Sacarose</b>	46,3	72,9	40,8	14,2	43,3	26,1
<b>Isolado LBBMA283</b>						
<b>Glicose</b>	38,3	53,0	32,1	75,6	41,7	7,2
<b>Sacarose</b>	56,7	54,7	62,5	81,8	44,2	63,1

A utilização da proteose peptona como fonte de nitrogênio propiciou a obtenção de culturas do isolado LBBMA155 com maiores atividade e concentração de biossurfactantes (Tabelas 7 e 8). Porém, os biossurfactantes presentes nesses extratos não levaram à obtenção de emulsões estáveis com o querosene, comparativamente aos resultados obtidos com as fontes inorgânicas de nitrogênio (Tabela 9). Os índices de emulsificação (E24) foram de apenas 5,3% em extratos produzidos em meio de cultura contendo glicose e de 13,2% quando sacarose foi a fonte de carbono. O melhor resultado foi obtido quando o isolado foi crescido em meio MM com sacarose e nitrato, com emulsificação inicial superior a 50% e estabilidade de aproximadamente 75%. Todavia, quando o isolado foi crescido em meio MM com glicose e nitrato, a emulsificação inicial foi de 36,3% e a estabilidade foi de apenas 7,9% (Tabela 9). Esses resultados indicam que as combinações entre fontes de carbono e de nitrogênio exercem forte influência na estrutura dos biossurfactantes produzidos pelo isolado LBBMA155. Essas possíveis modificações estruturais nas moléculas dos biossurfactantes, assim como as resultantes de alteração no potencial redox, podem ser exploradas para a obtenção de biossurfactantes com características desejáveis para diferentes aplicações, devendo ser também consideradas em operações de MEOR baseadas na produção “in situ” de biossurfactantes.

Nenhum dos tratamentos com nitrogênio apresentou influência significativa na tensão interfacial ar-líquido obtido durante o crescimento do isolado LBBMA111A em meio MM ( $P = 0,0682$ ). Já os tratamentos com sacarose e glicose foram estatisticamente diferentes ( $P < 0,01$ ). As tensões interfaciais obtidas no tratamento com sacarose foram mais baixas em relação ao tratamento com glicose (Tabela 7). O crescimento do isolado LBBMA111A em meio MM contendo glicose não proporcionou a produção de biossurfactantes pouco eficientes na redução da tensão interfacial (Tabela 7). Esse resultado foi atribuído ao baixo crescimento da bactéria nestas condições (Figura 6A).

O crescimento do isolado LBBMA111A em meio MM suplementado tanto com sacarose quanto com glicose resultou em produção ineficiente de biossurfactantes, fenômeno retratado por baixos valores de DMC (Tabela 8). O isolado apresentou crescimento vigoroso em meio MM suplementado com sacarose e proteose peptona, mas esse crescimento não refletiu em produção elevada de biossurfactantes (DMC = 1,7). Isso indica que, nessas condições, a sacarose não é uma boa fonte de carbono para a produção de biossurfactantes por esse isolado. Roongsawang et al. (2002) reportam resultados similares para o isolado *B. subtilis* BBK-1 crescendo em aerobiose,

observando que a glicose foi a melhor fonte de carbono para a produção de biossurfactantes pela bactéria, enquanto que a utilização de sacarose causou decréscimos na produção dos biossurfactantes surfactina e plipastatina.

Foram obtidas emulsões entre querosene e as culturas do isolado LBBMA111A produzidos em todas as combinações de fontes de carbono e de nitrogênio (Tabela 9), apesar da concentração relativamente baixa de biossurfactantes nesses extratos (Tabela 8). As emulsões mais estáveis foram obtidas quando o isolado foi crescido em meio MM contendo nitrato como fonte de nitrogênio, com estabilidades superiores a 65%, 24 horas após a formação das emulsões (Tabela 9).

A tensão interfacial ar-líquido propiciada pelos biossurfactantes produzidos pelo isolado LBBMA283 também demonstrou ser influenciada significativamente tanto por variações na fonte de carbono quanto na fonte de nitrogênio. Foi observada a existência de uma interação significativa entre os fatores fonte de carbono e fonte de nitrogênio ( $P = 0,0076$ ). Houve diferença significativa entre os valores de tensão interfacial ar-líquido obtidos quando o isolado LBBMA283 foi crescido em meio MM com glicose ou sacarose. Porém, essa diferença foi significativa somente quando a proteose peptona foi utilizada como fonte de nitrogênio (Tabela 10). Nessa condição, a tensão interfacial ar-líquido obtida em meio contendo glicose foi significativamente menor do que a obtida em meio MM com sacarose (Tabela 10). Foi observada diferença significativa entre os valores de tensão interfacial ar-líquido obtidos quando o isolado LBBMA283 foi crescido em meio MM com nitrato, amônio ou proteose peptona. No entanto, essa diferença só existiu quando a glicose foi a fonte de carbono utilizada (Tabela 10), condição em que a utilização de proteose peptona resultou na maior redução da tensão interfacial ar-líquido (Tabela 10). Valor de tensão interfacial inferior a  $40 \text{ mJ m}^{-2}$ , considerado limite para se assumir a presença de biossurfactantes de elevada atividade (COOPER *et al.*, 1979), foi obtido somente quando o isolado LBBMA283 foi crescido em meio MM com glicose e proteose peptona.

A sacarose proporcionou o melhor crescimento do isolado LBBMA283 em meio MM quando comparado ao tratamento com glicose, independentemente da fonte de nitrogênio utilizada (Figura 7B). No entanto, a produção de biossurfactantes por este isolado foi maior em meio MM contendo glicose e proteose peptona, onde a DMC foi de 2,7 (Tabela 8). Este valor é idêntico ao obtido com a mesma fonte de carbono na presença de extrato de levedura a  $1 \text{ g L}^{-1}$  (Tabela 3). Em todas as demais combinações

entre fontes de nitrogênio e de carbono, a produção de biossurfactantes foi considerada baixa (Tabela 8).

Assim como também reportado para o isolado LBBMA155, o tratamento que propiciou a obtenção dos extratos com os menores valores de tensão interfacial e com as maiores concentrações de biossurfactantes produzidos pelo isolado LBBMA283 (glicose e proteose peptona), não foi o que apresentou os melhores dados de emulsificação. O extrato obtido no tratamento acima referido apresentou estabilidade de emulsão de aproximadamente 7%, valor muito inferior ao dos demais tratamentos. O extrato com maior índice de emulsificação inicial e maior estabilidade da emulsão formada com querosene foi o obtido no tratamento composto por sacarose e sulfato de amônio, com mais de 60% de emulsificação inicial e aproximadamente 80% de estabilidade (Tabela 9). Esse fato novamente sugere que as combinações entre fontes de carbono e de nitrogênio exercem forte influência na estrutura dos biossurfactantes produzidos por isolados de *Bacillus*.

Tabela 10 - Tensão interfacial ar-líquido medida na cultura do isolado *Bacillus* sp. LBBMA283 em função de dois tratamentos com carbono e três tratamentos com nitrogênio, montados em um fatorial (2x3), com três repetições.

<b>Nitrogênio</b>			
<b>Carbono</b>	<b>Nitrato de sódio</b>	<b>Sulfato de amônio</b>	<b>Proteose Peptona</b>
<b>Sacarose</b>	44,07 Aa	46,17 Aa	43,73 Aa
<b>Glicose</b>	47,10 Aa	49,13 Aa	35,57 Bb

\* Valores seguidos de mesma letra (maiúscula) e na mesma linha ou valores seguidos de mesma letra (minúscula) e na mesma coluna não diferem entre si, a 5% de probabilidade.

## 5. CONCLUSÕES

Os isolados *Bacillus subtilis* LBBMA155, *Bacillus* sp. LBBMA111A e *Bacillus* sp. LBBMA283 foram capazes de crescer em condição anaeróbia na presença de nitrato como aceptor de elétrons e produzir biossurfactantes eficientes na redução da tensão interfacial ar-líquido.

O potencial redox demonstrou influenciar tanto o crescimento quanto a produção de biossurfactantes pelos isolados. O crescimento dos isolados LBBMA155 e LBBMA283 em meio MM reduzido é estimulado na presença de DNA.

A estrutura dos biossurfactantes produzidos pelos isolados de *Bacillus* parece ser afetada pelo potencial redox do meio de crescimento.

As fontes de carbono que proporcionaram o crescimento anaeróbio dos isolados foram glicose e sacarose. A sacarose proporcionou o melhor crescimento de todos os isolados.

Glicose foi a fonte de carbono que proporcionou maior atividade de biossurfactantes produzidos pelos isolados LBBMA283 e LBBMA111A.

A estrutura dos biossurfactantes produzidos pelos isolados de *Bacillus* parece ser afetada pelas combinações entre fontes de carbono e de nitrogênio.

Os três isolados apresentaram potencial para a utilização em MEOR baseada na produção *in situ* de biossurfactantes.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amiriyan, A.; Assadi, M.M.; Saggadian, V.A. e Noohi, A. (2004). Bioemulsan Production by Oil Reservoirs Microorganisms. **Iranian J Env Health Sci Eng**, 1: 26-35.
- APHA - American Public Health Association, AWWA - American Water Works Association, WEF - Water Environment Federation (1998). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20<sup>a</sup> ed. Washington: APHA, 1220p.
- Banat, I.M. (1995a). Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation - a review. **Bioresour Technol**, 51: 1-12.
- Banat, I.M.; Makkar, R.S. e Cameotra, S.S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl Microbiol Biotechnol**, 53: 495-508.
- Bohin J-P, Bohin A, Schaeffer P. (1976). Increased nitrate reductase A activity as a sign of membrane alteration in early blocked asporogenous mutants of *Bacillus subtilis*. **Biochimie**, 58: 99–108.
- Borovok, I.; Gorovitz, B.; Yanku, M.; Schreiber, R.; Gust, B.; Chater, K.; Aharonowitz, Y. e Cohen, G. (2004). Alternative oxygen-dependent and oxygen-independent ribonucleotide reductases in *Streptomyces*: cross-regulation and physiological role in response to oxygen limitation. **Mol Microbiol**, 54: 1022-1035.
- BP Statistical Review of World Energy June 2006. Disponível online em [www.bp.com/statisticalreview](http://www.bp.com/statisticalreview). Acesso em 13/01/2007.
- Brown, L.R.; Vadie, A.A. e Stephens, J.O. (2002). Slowing production decline and extending the economic life of an oil field: new MEOR technology. **SPE Reservoir Eval Eng**, 5: 33-41.

- Cameotra, S.S. e Makkar, R.S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Appl Microbiol Biotechnol**, 50: 520-529.
- Clark, J.B.; Munnecke, D.M. e Jenneman, G.E. (1981). In situ microbial enhancement of oil recovery. **Dev Ind Microbiol**, 2: 6-12.
- Cooper, D.G., MacDonald, C.R., Duff, S.J.B. e Kosaric, N. (1981a). Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation addition. **Appl Environ Microbiol**, 42: 408-412.
- Cooper, D.G., Zajic, J. E. e Gerson, D. F. (1979). Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*. **Appl Environ Microbiol**, 37: 4-10.
- Cruz Ramos, H., L. Boursier, I. Moszer, F. Kunst, A. Danchin, and P. Glaser. (1995). Anaerobic transcription activation in *Bacillus subtilis*: identification of distinct FNR-dependent and -independent regulatory mechanisms. **EMBO J**, 14: 5984–5994.
- Davis, D.A.; Lynch, H.C. e Varley, J. (1999). The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enz Microb Technol**, 25: 322-329.
- DeMoss, J.A. and Hsu, P.-Y. (1991). NarK enhances nitrate uptake and nitrite excretion in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, 173: 3303-3310.
- Dunny, G.M. e Leonard, B.A.B.(1997). Cell-Cell communication in gram-positive bacteria. **Annu Rev Microbiol**, 51: 527-64.
- Errington, J. (2003). Regulation of Endospore Formation in *Bacillus subtilis*. **Nat Rev Microbiol**, 1: 117-126.
- Folmsbee, M.; Duncan, K.; Han, S.O.; Nagle, D.; Jennings, E. e McInerney, M. (2006). Re-identification of the halotolerant, biosurfactant-producing *Bacillus licheniformis* strain JF-2 as *Bacillus mojavensis* strain JF-2. **Syst Appl Microbiol**, 29: 645–649.

- Folmsbee, M.J.; McInerney, M.J. e Nagle, D.P. (2004). Anaerobic Growth of *Bacillus mojavensis* and *Bacillus subtilis* Requires Deoxyribonucleosides or DNA. **Appl Environ Microbiol**, 70: 5252-5257.
- Fox, S.L. e Bala, G.A. (2000). Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Biores Technol**, 75: 235-240.
- Glaser, P., A. Danchin, F. Kunst, P. Zuber, and M. M. Nakano. (1995). Identification and isolation of a gene required for nitrate assimilation and anaerobic growth of *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol**, 177: 1112–1115.
- Hoffmann, T., B. Troup, A. Szabo, C. Hungerer, and D. Jahn. (1995). The anaerobic life of *Bacillus subtilis*: cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system. **FEMS Microbiol Lett**, 131: 219–225.
- Javaheri, M., Jenneman, G.E., McInerney, M.J. e Knapp, R.M. (1985). Anaerobic Production of a Biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Appl Environ Microbiol**, 50: 698-700.
- Jordan, A., and P. Reichard. 1998. Ribonucleotide Reductases. **Annu. Rev. Biochem.**, 67: 71-98.
- Kim, H.; Yoon, B.; Lee, C.; Suh, H.; Oh, H.; Katsuragi, T. e Tani, Y. (1997). Production and Properties of a Lipopeptide Biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **J Ferment Bioeng**, 84: 41-46.
- Krulwich, T.A.; Ito, M. e Gujanti, A.A. (2001). The Na.-dependence of alkaliphily in *Bacillus*. **Bioch Bioph Acta** 1505: 158-168.
- LaCelle, M., Kumano, M., Kurita, K., Yamane, K., Zuber, P. and Nakano, M.M. (1996). Oxygen-controlled regulation of favohemoglobin gene in *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol**, 178: 3803-3808.

- LaCelle, M., M. Kumano, K. Kurita, K. Yamane, P. Zuber, and M. M. Nakano. (1996). Oxygen-controlled regulation of flavohemoglobin gene in *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol**, 178: 3803–3808.
- Lazazzera, B.A.; Solomon, J.M. e Grossman, A.D. (1997). An Exported Peptide Functions Intracellularly to Contribute to Cell Density Signaling in *B. subtilis*. **Cell**, 89: 917-925.
- Li, Q.; Kang, C.; Wang, H.; Liu, C. e Zhang, C.(2000). Application of microbial enhanced oil recovery technique to Daqing Oilfield. **Biochem Eng J**, 11: 197-199.
- Lin SC, Minton MA, Sharma MM, Georgiou, G. (1994). Structural and immunological characterization of a biosurfactant produced by a *Bacillus licheniformis* JF-2. **Appl Environ Microbiol**, 60: 31-38.
- Lin, S.C.; Minton, M.A.; Sharma, M.M. e Georgiou, G. (1994) Structural and immunological characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Appl Environ Microbiol** 60: 31-38.
- Lundquist, A.D.; Cheney, D.; Powell, C.L.; O'Neill, P.; Norton, G.; Veneman, A.M.; Evans, D.L.; Mineta, N.Y.; Abraham, S.; Allbaugh, J.M.; Whitman, C.T.; Bolten, J.B.; Daniels, M.E.; Lindsey, L.B. e Barrales, R. (2001) Energy for a New Century: Increasing Domestic Energy Production. **National energy policy report of the National Energy Policy Development Group. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.**
- Makkar, R.S. e Cameotra, S.S. (1997). Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 18: 37-42.
- Makkar, R.S. e Cameotra, S.S. (1998). Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. **J Microbiol Biotechnol**, 20: 48-52.

- Maneerat, S. (2005). Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **Songklanakarín J Sci Technol**, 27: 675-683.
- Maugdalya, S.; Knapp, R.M.; McInerney, M.J.; Nagle, D.P. e Folsmbee, M.J. (2004). Development of a biosurfactant-based enhanced oil recovery procedure. SPE 89473. **In Proceedings of the SPE/ DOE Improved Oil Recovery Symposium**. Society of Petroleum Engineers, Richardson, Texas.
- McInerney, M. J., Nagle, D. P., and Knapp, R. M. Microbially enhanced oil recovery: past, present, and future, pp. 215-237. In: M. Magot and B. Ollivier, **Petroleum Microbiology**, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C., 2005.
- Mukherjee, A.K. e Das, K. (2005). Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. **FEMS Microbiol Ecol**, 54: 479–489.
- Mukherjee, S.; Das, P. e Sem, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends Biotechnol**, 24: 509-515.
- Nakano, M. M., P. Zuber, P. Glaser, A. Danchin, and F. M. Hulett. (1996). Two-component regulatory proteins ResD-ResE are required for transcriptional activation of *fnr* upon oxygen limitation in *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol**, 178: 3796–3802.
- Nakano, M.M. e Hulett, F.M. (1997). Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation. **FEMS Microbiol Lett**, 157: 1-7.
- Nakayama, S.; Takahashi, S.; Hirai, M. e Shoda, M.(1997). Isolation of new variants of surfactin by a recombinant *Bacillus subtilis*. **Appl Microbiol Biotechnol**, 48: 80-82.
- Nitschke, M. e Pastore, G. (2006). Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Biores Technol**, 97: 336-341.
- Nitschke, M.; Costa, S.G.V.A.; Haddad, R.; Gonçalves, L.A.G.; Eberlin, M.N. e Contiero, J. (2005). Oil Wastes as Unconventional Substrates for Rhamnolipid

- Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnol Prog**, 21: 1562-1566.
- Ohno, A.; Ano, T. e Shoda, M. (1995). Effect of Temperature on Production of Lipopeptide Antibiotics, Iturin A and Surfactin by a Dual Producer, *Bacillus subtilis* RB14, in Solid-State Fermentation. **J Ferment Bioeng**, 80: 517-519.
- Okpokwasili, G.C, e Ibiene, A.A. (2006). Enhancement of recovery of residual oil using a biosurfactant slug. **Afr J Biotechnol**, 5: 453-456.
- Pham, T.H.; Jeremy S.; Webb, J.S. e Rehm, B.H.A. (2004). The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. **Microbiol**, 150: 3405-3413.
- Ramos, H.C.; Hoffmann, T.; Marino, M.; Nedjari, H.; Presecan-Siedel, E.; Dreesen, O.; Glaser, P. e Jahn, D. (2000). Fermentative Metabolism of *Bacillus subtilis*: Physiology and Regulation of Gene Expression. **J Bacteriol**, 182: 3072-3080.
- Planckaert, M. Oil reservoir and oil production, pp. 3-19. In: M. Magot and B. Ollivier, **Petroleum Microbiology**, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C., 2005.
- Reasoner, D.J. e Geldreich, E.E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. **Appl Environ Microbiol**, 49: 1-7.
- Roongsawang, N.; Thaniyavarn, J.; Thaniyavarn, S.; Kameyama, T.; Haruki, M.; Imanaka, T.; Morikawa, M. e Kanaya, S. (2002). Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin, and surfactin. **Extremophiles**, 6: 499-506.

- Schirawski J, Uden G. (1995). Anaerobic respiration of *Bacillus macerans* with fumarate, TMAO, nitrate and nitrite and regulation of the pathways by oxygen and nitrate. **Arch Microbiol**, 163: 148–54.
- Schirawski, J., and G. Uden. (1995). Anaerobic respiration of *Bacillus macerans* with fumarate, TMAO, nitrate and nitrite and regulation of the pathways by oxygen and nitrate. **Arch Microbiol**, 163: 148–154.
- Shariati, P., W. J. Mitchell, A. Boyd, and F. G. Priest. (1995). Anaerobic metabolism in *Bacillus licheniformis* NCIB 6346. **Microbiology**, 141: 1117–1124.
- Soudmand-asli, A.; Ayatollahi, S.S.; Mohabatkar, H.; Zareie, M. e Shariatpanahi, S.F. (2007). The *in situ* microbial enhanced oil recovery in fractured porous media. **J Petr Sci Eng**, Article In Press.
- Strappa, L.A.; DeLucia, J.P.; Maure, M.A. e Lopez Llopiz, M.L. (2004). A novel and successful MEOR pilot project in a strong water-drive reservoir. SPE 89456. **In Proceedings of the SPE/ DOE Improved Oil Recovery Symposium**. Society of Petroleum Engineers, Richardson, Texas.
- Sun, G., E. Sharkova, R. Chestnut, S. Birkey, M. F. Duggan, A. Sorokin, P. Pujic, S. D. Ehrlich, and F. M. Hulett. (1996). Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol**, 178: 1374–1385.
- Tabatabaee, A.; Assadi, M.M.; Saggadian, Noohi, A.A. e Sajadian, V.A. (2005). Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoir. **Iranian J Env Health Sci Eng**, 2: 6-12.
- Thaniyavarn, J.; Thaniyavarn, N.; Thaniyavarn, T.; Thaniyavarn, M.; Imanaka, T.; Moricawa, M. e Kanaya, S. (2003). Production and characterization of biosurfactants from *Bacillus licheniformis* F2.2. **Biosci Biotechnol Biochem**, 67: 1239-1244.

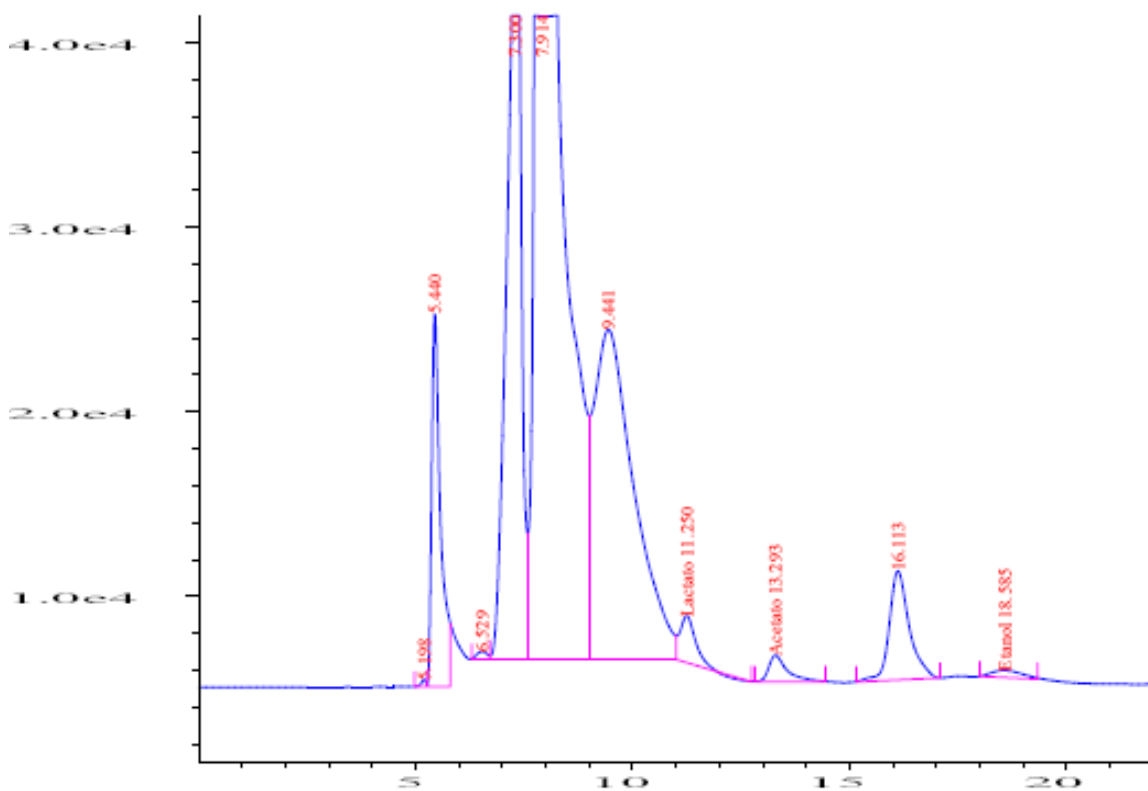
- Yakimov, M.M.; Amro, M.M.; Bock, M.; Boseker, K.; Fredrickson, H.L.; Kessel, D.G. e Timmis, K.N. (1997). The potential of *Bacillus licheniformis* strains for in situ enhanced oil recovery. **J Petr Sci Eng**, 18: 147-160.
- Yakimov, M.M.; Timmis, K.N.; Wray, V. e Fredrickson, H.L. (1995). Characterization of a New Lipopeptide Surfactant Produced by Thermotolerant and Halotolerant Subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. **Appl Environ Microbiol**, 61: 1706-1713.
- Youssef, N.; Simpson, D.R.; Duncan, K.E.; McInerney, M.J.; Folmsbee, M.; Fincher, T. e Knapp, R.M. (2006). In-situ biosurfactant production by injected *Bacillus* strains in a limestone petroleum reservoir. **Appl Environ Microbiol**, accepted in 15 December 2006.
- Zigha, A.; Rosenfeld, E.; Schmitt, P. e Duport, C. (2006) Anaerobic cells of *Bacillus cereus* F4430/73 respond to low oxidoreduction potential by metabolic readjustments and activation of enterotoxin expression. **Arch Microbiol** 185: 222-233.



## **ANEXO 1**

### **Análise dos produtos do metabolismo anaeróbio dos isolados por HPLC**

Análise em HPLC do sobrenadante Isolado LBBMA155 crescido em meio MM sem a adição de ditiotreitol. A bactéria foi incubada estaticamente a 30° C até atingir a fase estacionária de crescimento.



External Standard Report

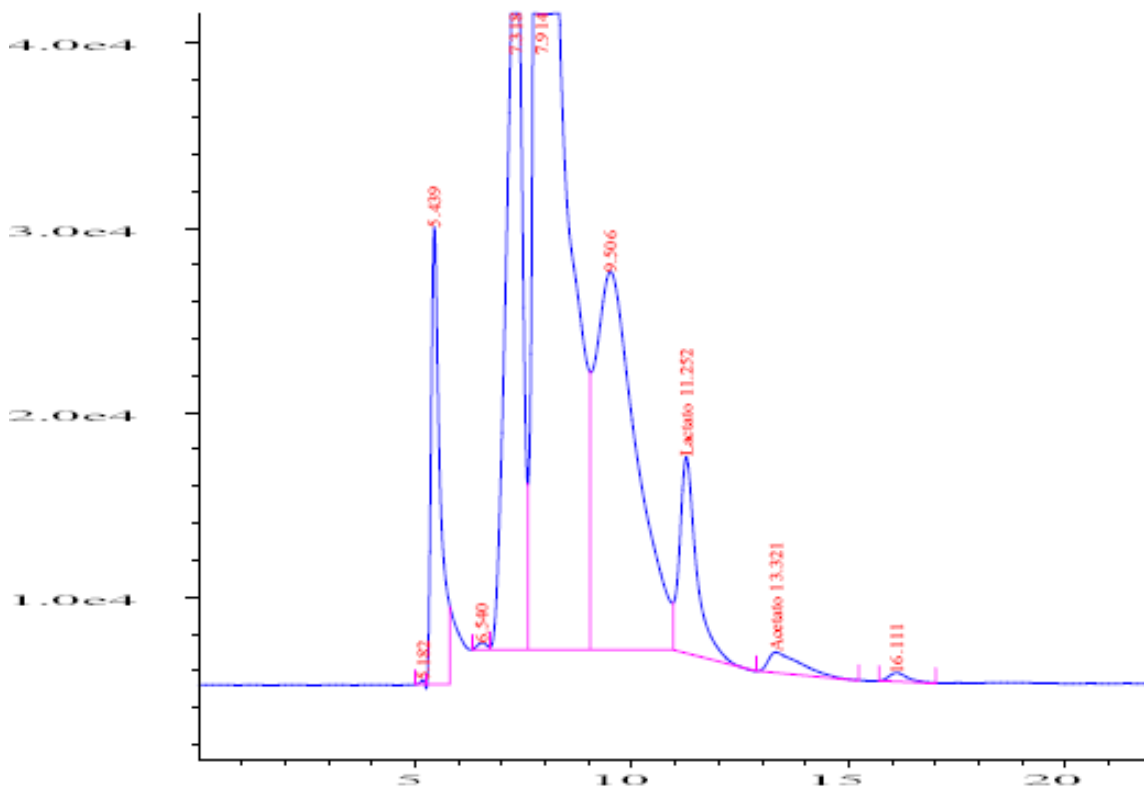
```

Data File Name   : C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-100000.D
Operator        : Marcelo Anaerobios
Instrument       : ANALYZER1
Sample Name     : Amostra 1
Run Time Bar Code:
Acquired on    : 29 Jun 07 08:35 PM
Report Created on: 02 Jul 07 11:58 PM
Last Recalib on : 07 MAY 04 06:02 PM
Multiplier     : 1
Page Number    : 1
Vial Number    : 1
Injection Number:
Sequence Line  :
Instrument Method: HILARIO.MTH
Analysis Method : HILARIO.MTH
Sample Amount  : 0
ISTD Amount    :
  
```

Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-100000.D

Ret Time	Area	Type	Width	Ref#	mM	Name
10.464	* not found *			1		Succinato
11.250	61560	MM T	0.403	1	9.421	Lactato
12.232	* not found *			1		Formato
13.293	43690	MM T	0.506	1	12.313	Acetato
15.690	* not found *			1		Propionato
18.585	18808	MM T	0.804	1	4.298	Etanol
19.330	* not found *			1		Butirato

Análise em HPLC do sobrenadante Isolado LBBMA155 crescido em meio MM reduzido com 0,125 mmol L<sup>-1</sup> de ditiotreitól. A bactéria foi incubada estaticamente a 30° C até atingir a fase estacionária de crescimento.



External Standard Report

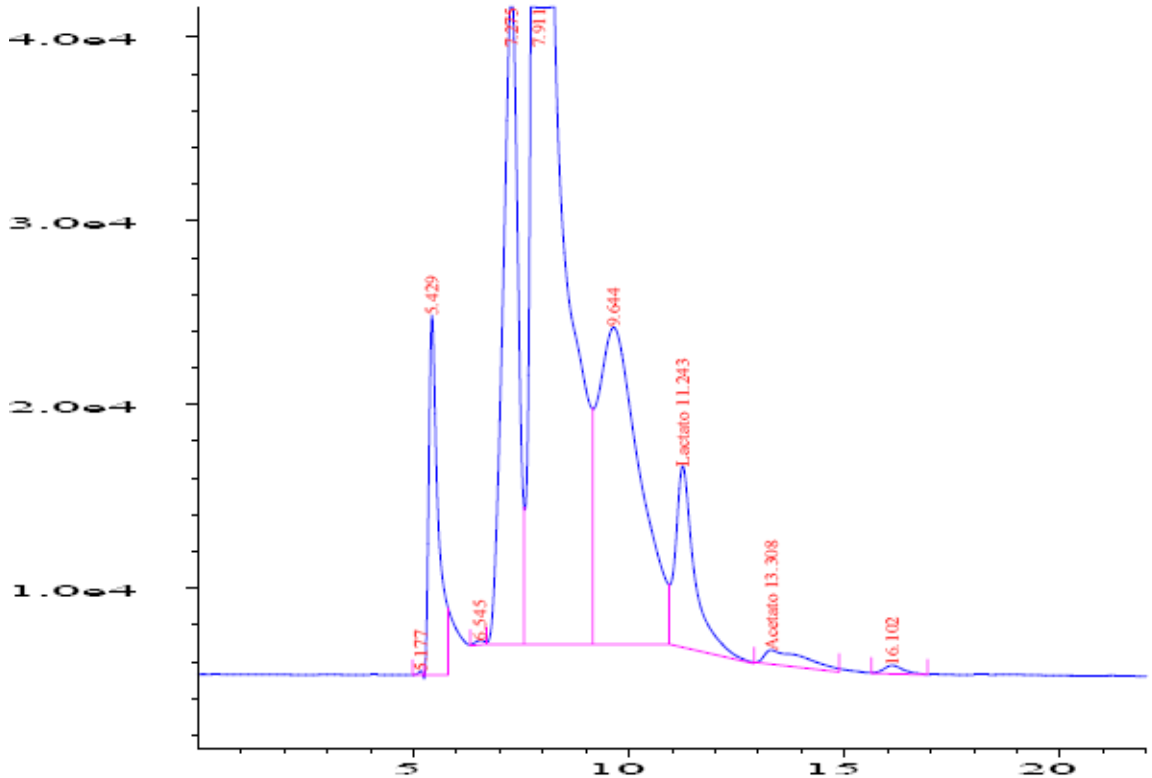
```

Data File Name   : C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-400001.D
Operator        : Marcelo Anaerobios
Instrument       : ANALYZER1
Sample Name     : Amostra 4
Run Time Bar Code:
Acquired on    : 29 Jun 07 08:58 PM
Report Created on: 03 Jul 07 00:31 AM
Last Recalib on : 07 MAY 04 06:02 PM
Multiplier     : 1
Page Number    : 1
Vial Number    : 1
Injection Number:
Sequence Line :
Instrument Method: HILARIO.MTH
Analysis Method : HILARIO.MTH
Sample Amount  : 0
ISTD Amount   :
  
```

Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-400001.D

Ret Time	Area	Type	Width	Ref#	mM	Name
10.464	* not found *			1		Succinato
11.252	292019	MM T	0.458	1	40.167	Lactato
12.232	* not found *			1		Formato
13.321	58896	MM T	0.883	1	15.686	Acetato
15.690	* not found *			1		Propionato
18.636	* not found *			1		Etanol
19.330	* not found *			1		Butirato

Análise em HPLC do sobrenadante Isolado LBBMA155 crescido em meio MM reduzido com 0,250 mmol L<sup>-1</sup> de ditiotreitól. A bactéria foi incubada estaticamente a 30° C até atingir a fase estacionária de crescimento.



External Standard Report

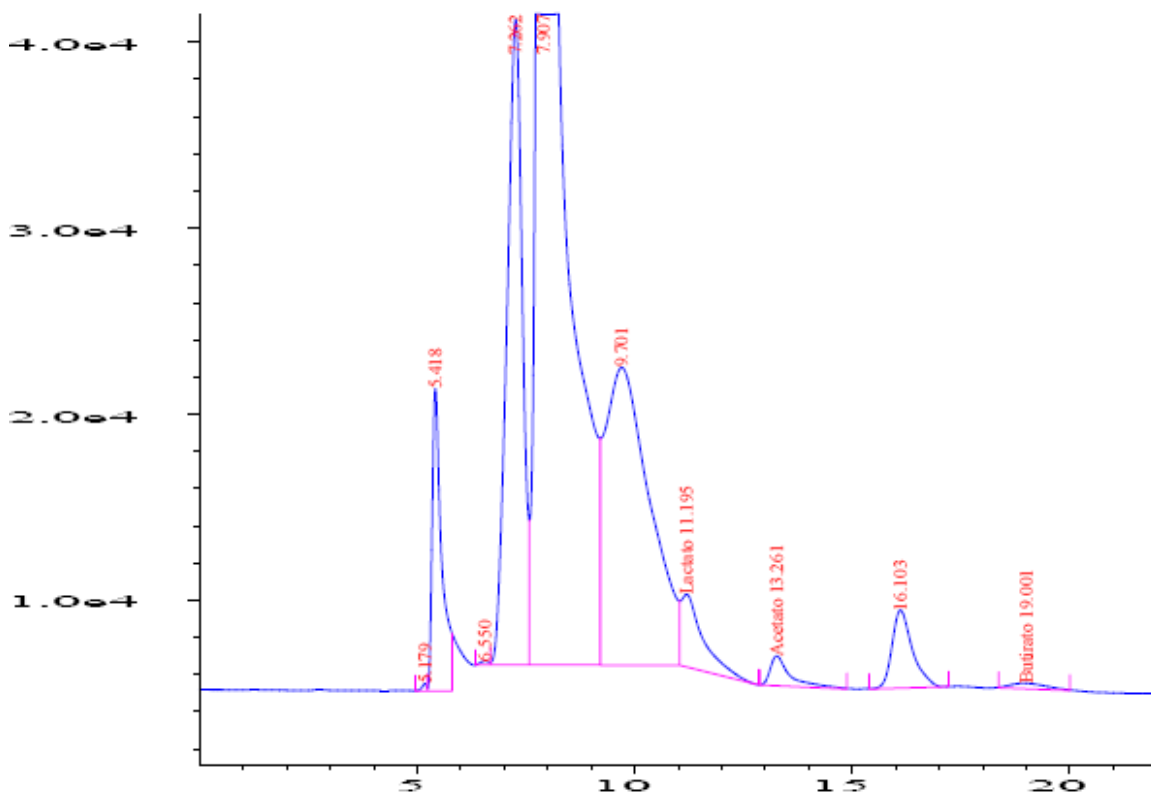
```

Data File Name   : C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-700002.D
Operator        : Marcelo Anaerobios
Instrument       : ANALYZER1
Sample Name     : Amostra 7
Run Time Bar Code:
Acquired on    : 29 Jun 07 09:21 PM
Report Created on: 03 Jul 07 00:34 AM
Last Recalib on : 07 MAY 04 06:02 PM
Multiplier     : 1
Page Number    : 1
Vial Number    : 1
Injection Number:
Sequence Line :
Instrument Method: HILARIO.MTH
Analysis Method : HILARIO.MTH
Sample Amount  : 0
ISTD Amount    :
  
```

Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-700002.D

Ret Time	Area	Type	Width	Ref#	mM	Name
10.464	* not found *			1		Succinato
11.243	312191	MM T	0.527	1	42.858	Lactato
12.232	* not found *			1		Formato
13.308	55276	MM T	1.195	1	14.883	Acetato
15.690	* not found *			1		Propionato
18.636	* not found *			1		Etanol
19.330	* not found *			1		Butirato

Análise em HPLC do sobrenadante Isolado LBBMA155 crescido em meio MM reduzido com 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de ditiotreitól. A bactéria foi incubada estaticamente a 30° C até atingir a fase estacionária de crescimento.



External Standard Report

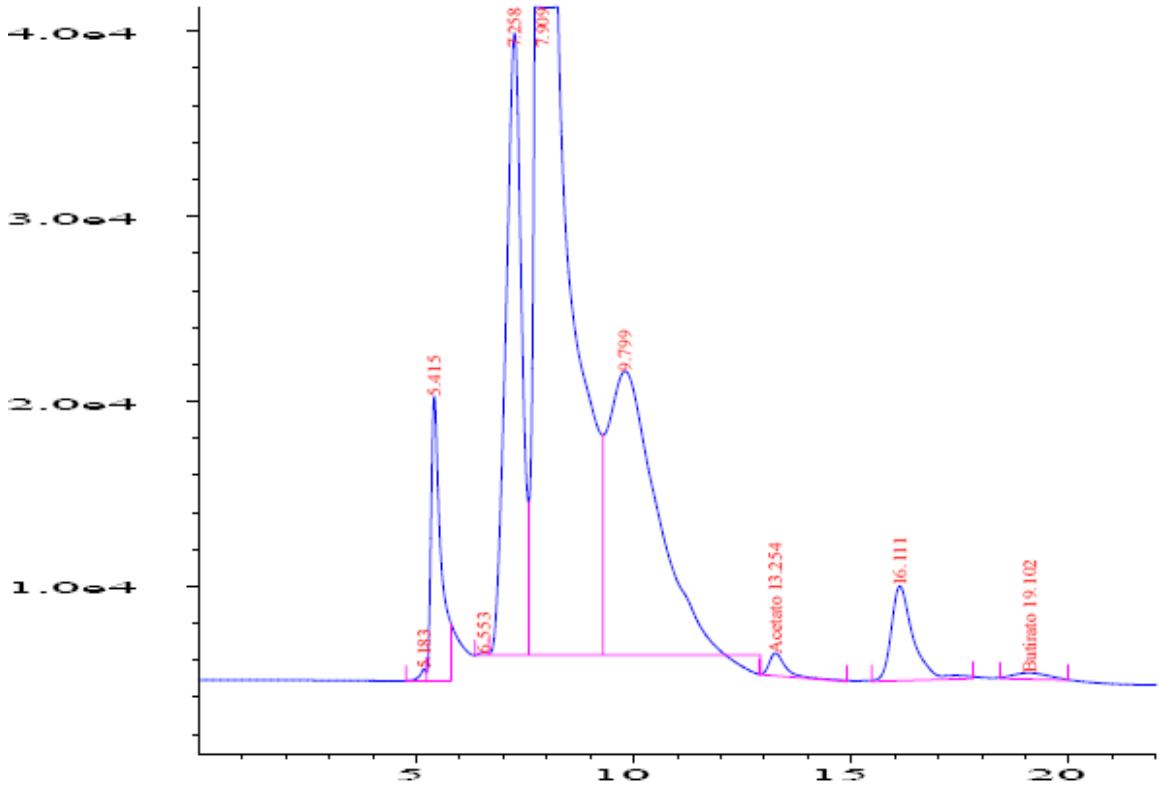
```

Data File Name   : C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-100003.D
Operator        : Marcelo Anaerobios
Instrument       : ANALYZER1
Sample Name     : Amostra 10
Run Time Bar Code:
Acquired on    : 29 Jun 07 09:44 PM
Report Created on: 03 Jul 07 00:03 AM
Last Recalib on : 07 MAY 04 06:02 PM
Multiplier     : 1
Page Number    : 1
Vial Number    : 1
Injection Number:
Sequence Line  :
Instrument Method: HILARIO.MTH
Analysis Method: HILARIO.MTH
Sample Amount  : 0
ISTD Amount    :
  
```

Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-100003.D

Ret Time	Area	Type	Width	Ref#	mM	Name
10.464	* not found *			1		Succinato
11.195	140768	MM T	0.601	1	19.988	Lactato
12.232	* not found *			1		Formato
13.261	51491	MM T	0.535	1	14.043	Acetato
15.690	* not found *			1		Propionato
18.636	* not found *			1		Etanol
19.001	17228	MM T	0.957	1	1.850	Butirato

Análise em HPLC do sobrenadante Isolado LBBMA111A crescido em meio MM sem a adição de ditiotreitol. A bactéria foi incubada estaticamente a 30° C até atingir a fase estacionária de crescimento.



External Standard Report

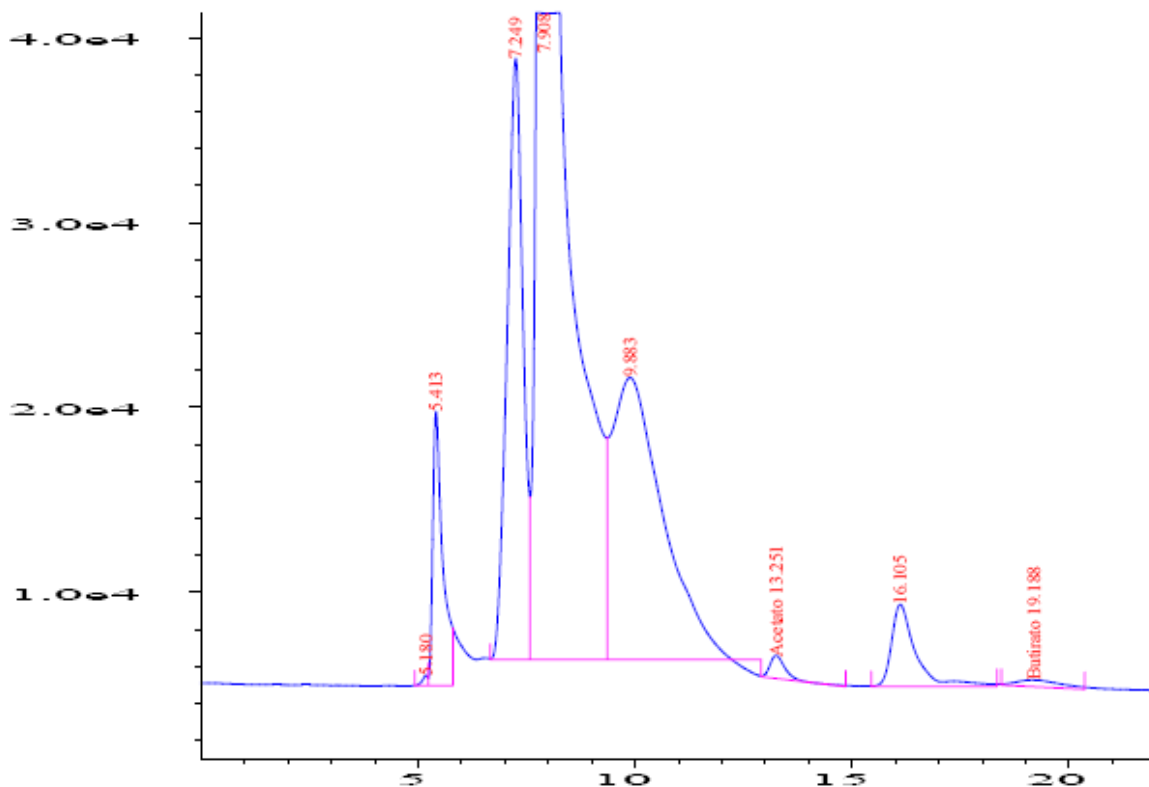
```

Data File Name   : C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-130004.D
Operator        : Marcelo Anaerobios
Instrument       : ANALYZER1
Sample Name     : Amostra 13
Run Time Bar Code:
Acquired on    : 29 Jun 07 10:07 PM
Report Created on: 03 Jul 07 00:06 AM
Last Recalib on : 07 MAY 04 06:02 PM
Multiplier     : 1
Page Number    : 1
Vial Number    : 1
Injection Number:
Sequence Line :
Instrument Method: HILARIO.MTH
Analysis Method : HILARIO.MTH
Sample Amount  : 0
ISTD Amount    :
    
```

Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-130004.D

Ret Time	Area	Type	Width	Ref#	mM	Name
10.464	* not found *			1		Succinato
11.086	* not found *			1		Lactato
12.232	* not found *			1		Formato
13.254	32590	MM T	0.443	1	9.951	Acetato
15.690	* not found *			1		Propionato
18.636	* not found *			1		Etanol
19.102	19707	MM T	0.947	1	2.116	Butirato

Análise em HPLC do sobrenadante Isolado LBBMA111A crescido em meio MM reduzido com 0,125 mmol L<sup>-1</sup> de ditioneitol. A bactéria foi incubada estaticamente a 30° C até atingir a fase estacionária de crescimento.



=====  
 External Standard Report  
 =====

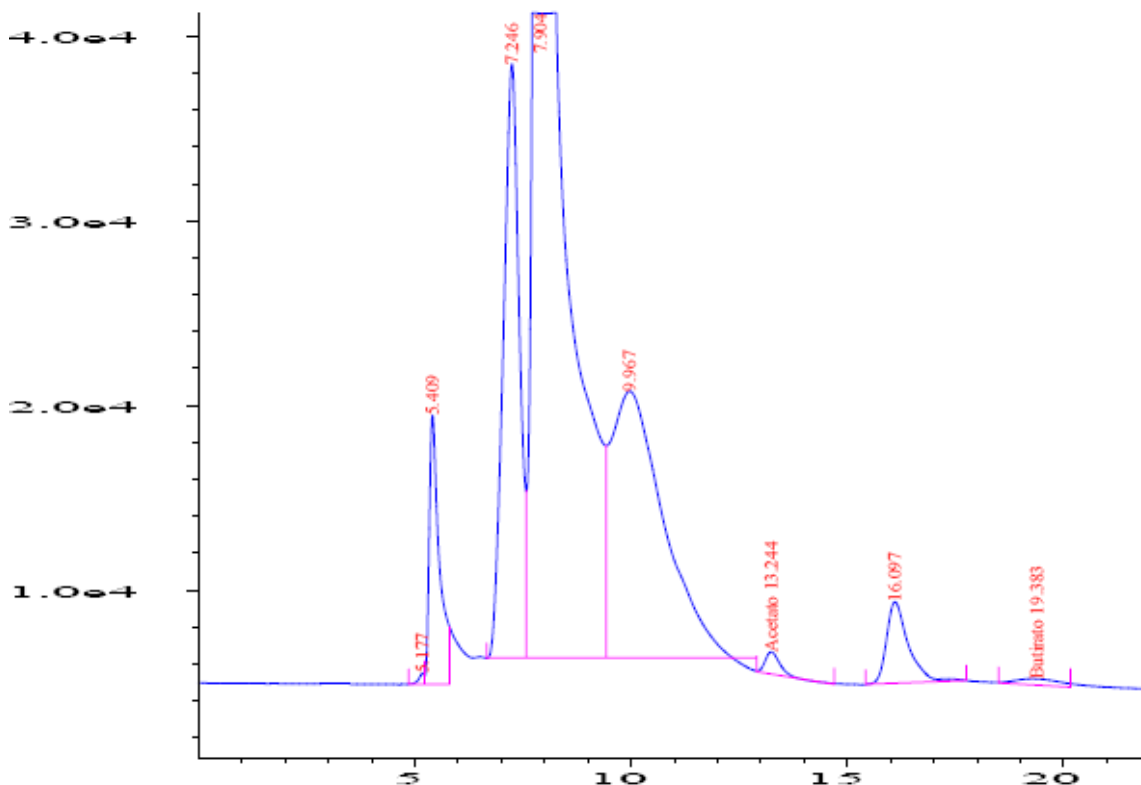
```

Data File Name   : C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-160005.D
Operator        : Marcelo Anaerobios
Instrument       : ANALYZER1
Sample Name     : Amostra 16
Run Time Bar Code:
Acquired on    : 29 Jun 07 10:44 PM
Report Created on: 03 Jul 07 00:08 AM
Last Recalib on : 07 MAY 04 06:02 PM
Multiplier     : 1
Page Number    : 1
Vial Number    : 1
Injection Number:
Sequence Line :
Instrument Method: HILARIO.MTH
Analysis Method : HILARIO.MTH
Sample Amount  : 0
ISTD Amount    :
  
```

Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-160005.D

Ret Time	Area	Type	Width	Ref#	mM	Name
10.464	* not found *			1		Succinato
11.086	* not found *			1		Lactato
12.232	* not found *			1		Formato
13.251	30447	MM T	0.408	1	9.375	Acetato
15.690	* not found *			1		Propionato
18.636	* not found *			1		Etanol
19.188	26831	MM T	1.211	1	2.881	Butirato

Análise em HPLC do sobrenadante Isolado LBBMA111A crescido em meio MM reduzido com 0,25 mmol L<sup>-1</sup> de ditioneitol. A bactéria foi incubada estaticamente a 30° C até atingir a fase estacionária de crescimento.



External Standard Report

```

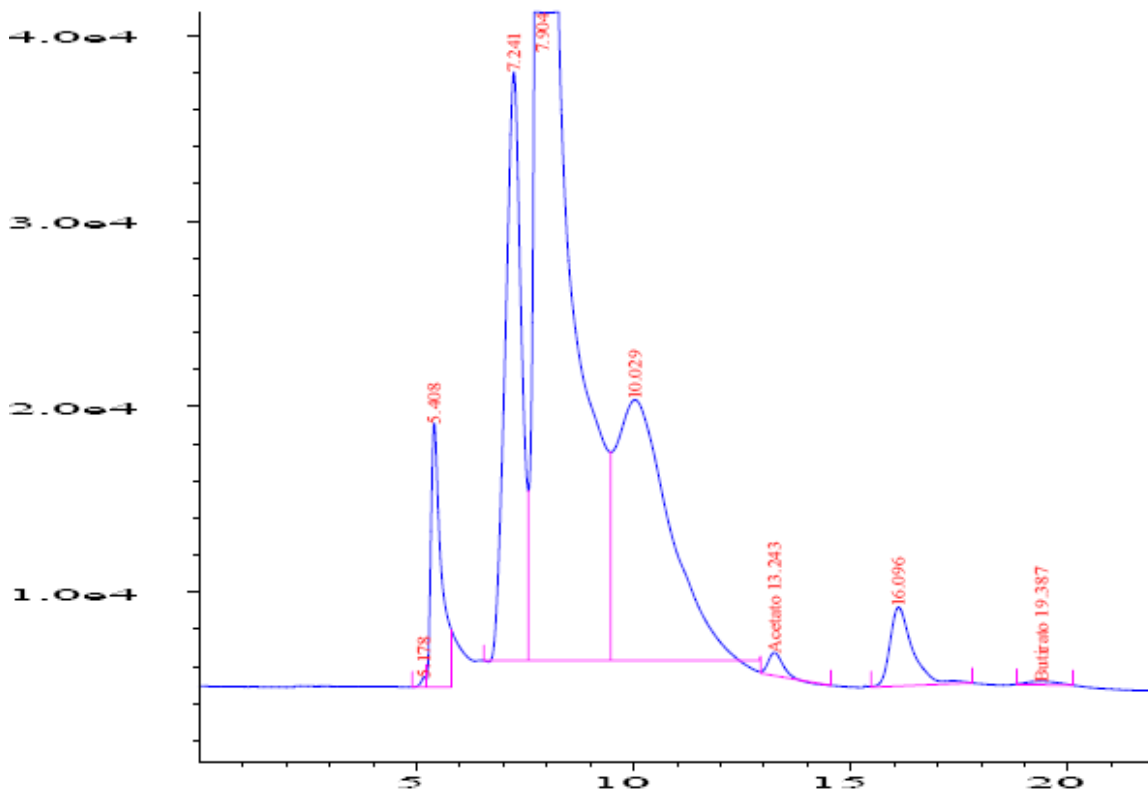
Data File Name   : C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-190006.D
Operator        : Marcelo Anaerobios
Instrument       : ANALYZER1
Sample Name     : Amostra 19
Run Time Bar Code:
Acquired on    : 29 Jun 07 11:07 PM
Report Created on: 03 Jul 07 00:10 AM
Last Recalib on : 07 MAY 04 06:02 PM
Multiplier     : 1
Page Number    : 1
Vial Number    : 1
Injection Number:
Sequence Line :
Instrument Method: HILARIO.MTH
Analysis Method: HILARIO.MTH
Sample Amount  : 0
ISTD Amount    :
  
```

Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-190006.D

Ret Time	Area	Type	Width	Ref#	mM	Name
10.464	* not found *			1		Succinato
11.086	* not found *			1		Lactato
12.232	* not found *			1		Formato
13.244	28162	MM T	0.274	1	8.968	Acetato
15.690	* not found *			1		Propionato
18.636	* not found *			1		Etanol
19.383	23648	MM T	1.141	1	2.539	Butirato



Análise em HPLC do sobrenadante Isolado LBBMA111A crescido em meio MM reduzido com 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de ditiotreitól. A bactéria foi incubada estaticamente a 30° C até atingir a fase estacionária de crescimento.



External Standard Report

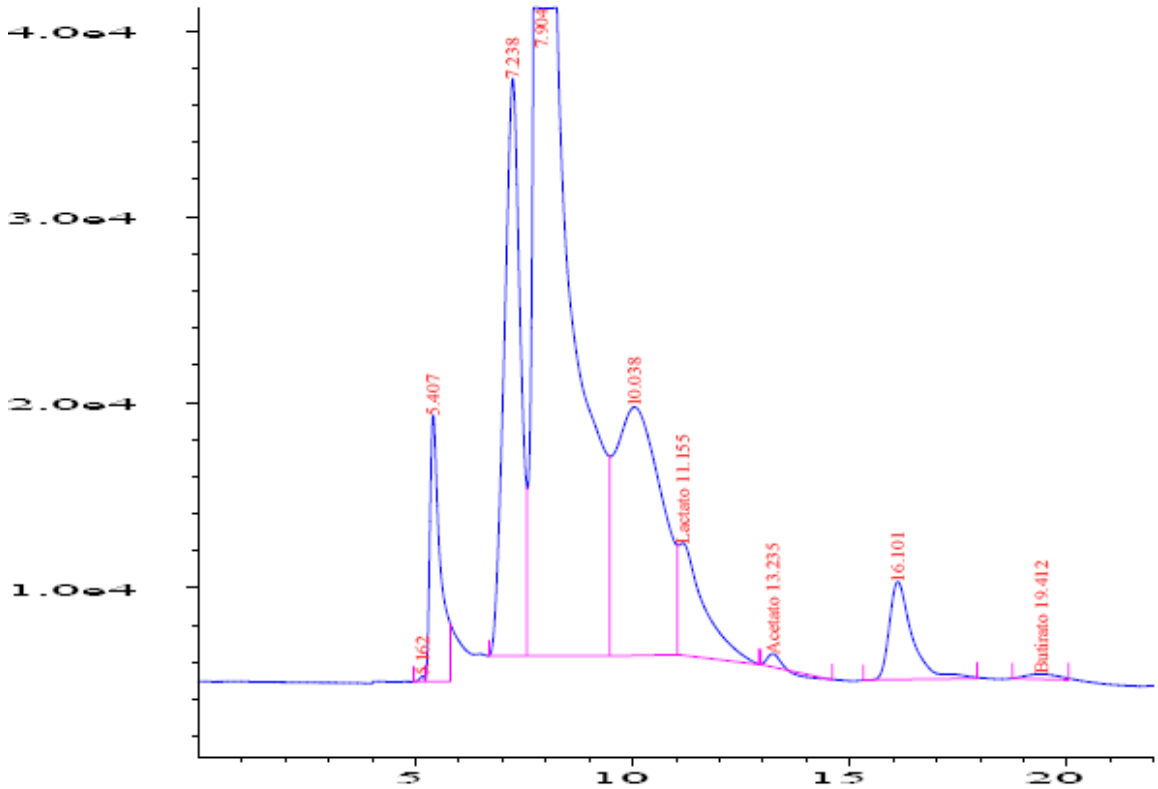
```

Data File Name   : C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-220007.D
Operator        : Marcelo Anaerobios
Instrument       : ANALYZER1
Sample Name     : Amostra 22
Run Time Bar Code:
Acquired on    : 29 Jun 07 11:30 PM
Report Created on: 03 Jul 07 00:14 AM
Last Recalib on : 07 MAY 04 06:02 PM
Multiplier     : 1
Page Number    : 1
Vial Number    : 1
Injection Number:
Sequence Line :
Instrument Method: HILARIO.MTH
Analysis Method : HILARIO.MTH
Sample Amount  : 0
ISTD Amount   :
    
```

Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-220007.D

Ret Time	Area	Type	Width	Ref#	mM	Name
10.464	* not found *			1		Succinato
11.086	* not found *			1		Lactato
12.232	* not found *			1		Formato
13.243	27365	MM T	0.368	1	8.692	Acetato
15.690	* not found *			1		Propionato
18.636	* not found *			1		Etanol
19.387	9094	MM T	0.827	1	0.976	Butirato

Análise em HPLC do sobrenadante Isolado LBBMA283 crescido em meio MM sem a adição de ditiotreitol. A bactéria foi incubada estaticamente a 30° C até atingir a fase estacionária de crescimento.



External Standard Report

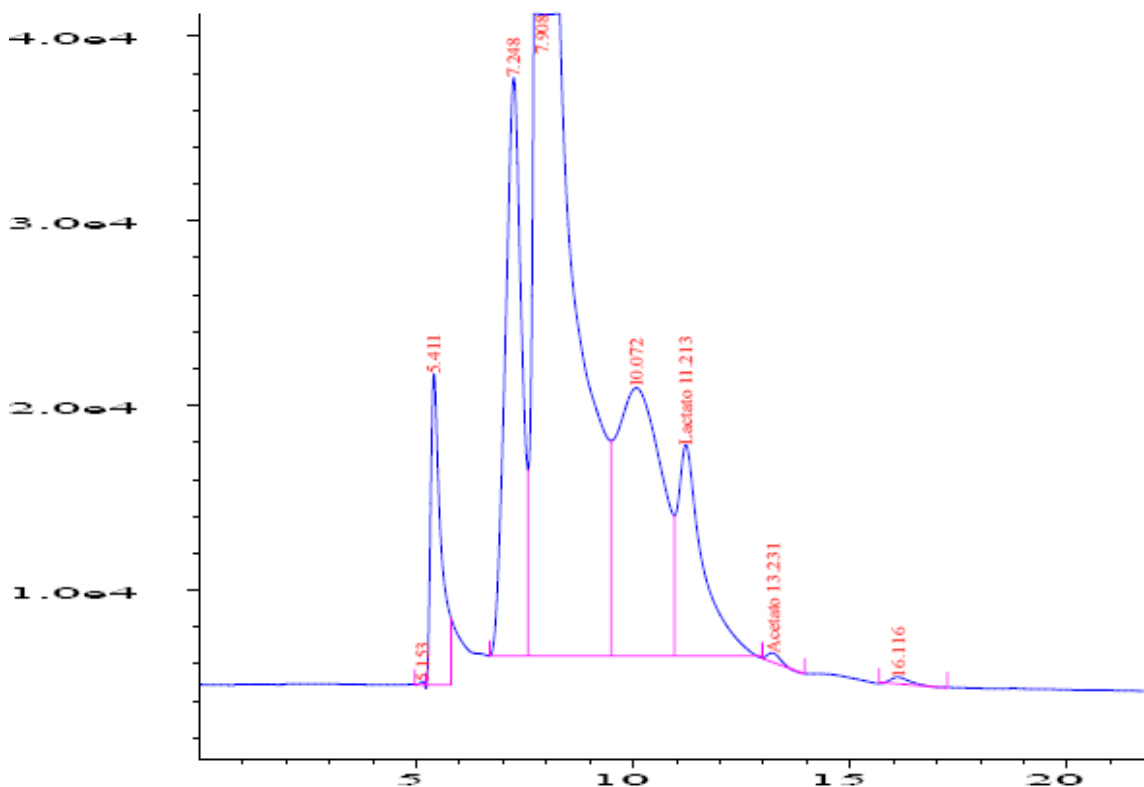
```

Data File Name   : C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-250008.D
Operator        : Marcelo Anaerobios
Instrument       : ANALYZER1
Sample Name     : Amostra 25
Run Time Bar Code:
Acquired on    : 29 Jun 07 11:53 PM
Report Created on: 03 Jul 07 00:19 AM
Last Recalib on : 07 MAY 04 06:02 PM
Multiplier     : 1
Page Number    : 1
Vial Number    : 1
Injection Number:
Sequence Line  :
Instrument Method: HILARIO.MTH
Analysis Method : HILARIO.MTH
Sample Amount  : 0
ISTD Amount    :
  
```

Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-250008.D

Ret Time	Area	Type	Width	Ref#	mM	Name
10.464	* not found *			1		Succinato
11.155	251406	MM T	0.493	1	34.749	Lactato
12.232	* not found *			1		Formato
13.235	8622	MM T	0.200	1	4.535	Acetato
15.690	* not found *			1		Propionato
18.636	* not found *			1		Etanol
19.412	14017	MM T	0.840	1	1.505	Butirato

Análise em HPLC do sobrenadante Isolado LBBMA283 crescido em meio MM reduzido com 0,125 mmol L<sup>-1</sup> de ditioneitol. A bactéria foi incubada estaticamente a 30° C até atingir a fase estacionária de crescimento.



=====  
 External Standard Report  
 =====

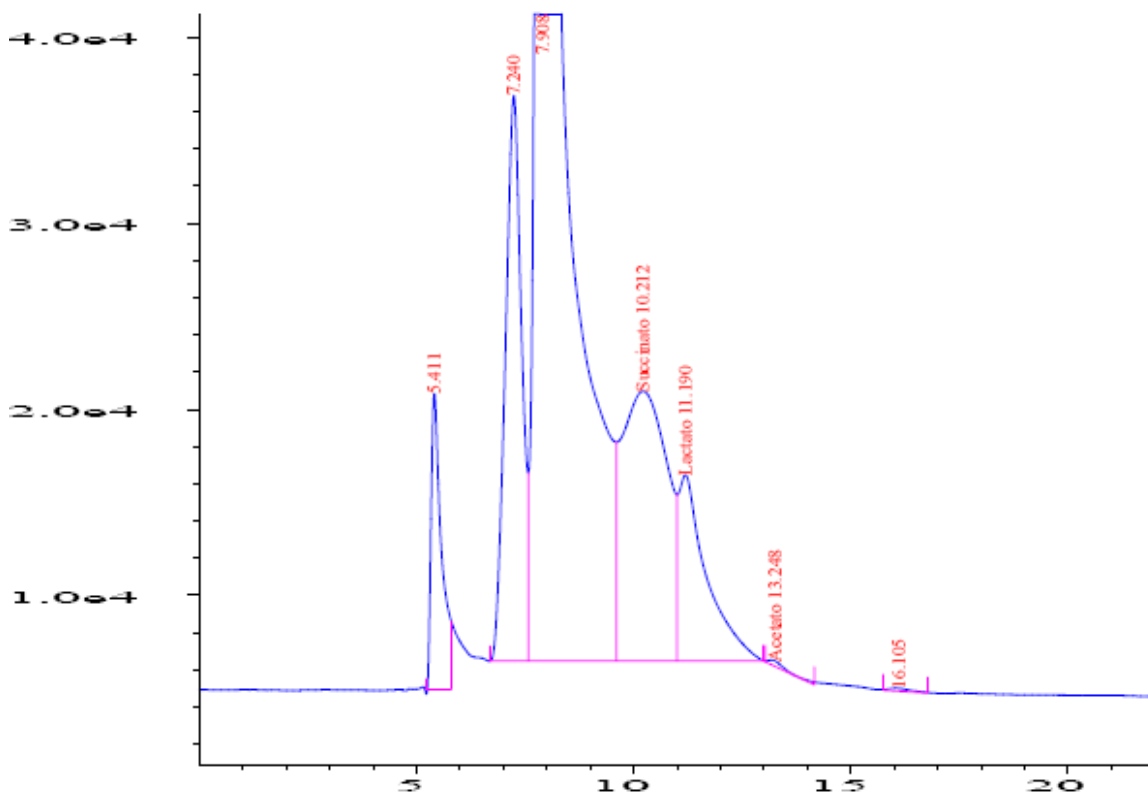
```

Data File Name   : C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-280009.D
Operator        : Marcelo Anaerobios
Instrument       : ANALYZER1
Sample Name     : Amostra 28
Run Time Bar Code:
Acquired on    : 30 Jun 07 00:16 AM
Report Created on: 03 Jul 07 00:21 AM
Last Recalib on : 07 MAY 04 06:02 PM
Multiplier     : 1
Page Number    : 1
Vial Number    : 1
Injection Number:
Sequence Line :
Instrument Method: HILARIO.MTH
Analysis Method : HILARIO.MTH
Sample Amount  : 0
ISTD Amount    :
  
```

Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-280009.D

Ret Time	Area	Type	Width	Ref#	mM	Name
10.464	* not found *			1		Succinato
11.213	467572	HH	0.560	1	63.587	Lactato
12.232	* not found *			1		Formato
13.231	9904	MM T	0.323	1	4.819	Acetato
15.690	* not found *			1		Propionato
18.636	* not found *			1		Etanol
19.330	* not found *			1		Butirato

Análise em HPLC do sobrenadante Isolado LBBMA283 crescido em meio MM reduzido com 0,25 mmol L<sup>-1</sup> de ditioneitol. A bactéria foi incubada estaticamente a 30° C até atingir a fase estacionária de crescimento.



External Standard Report

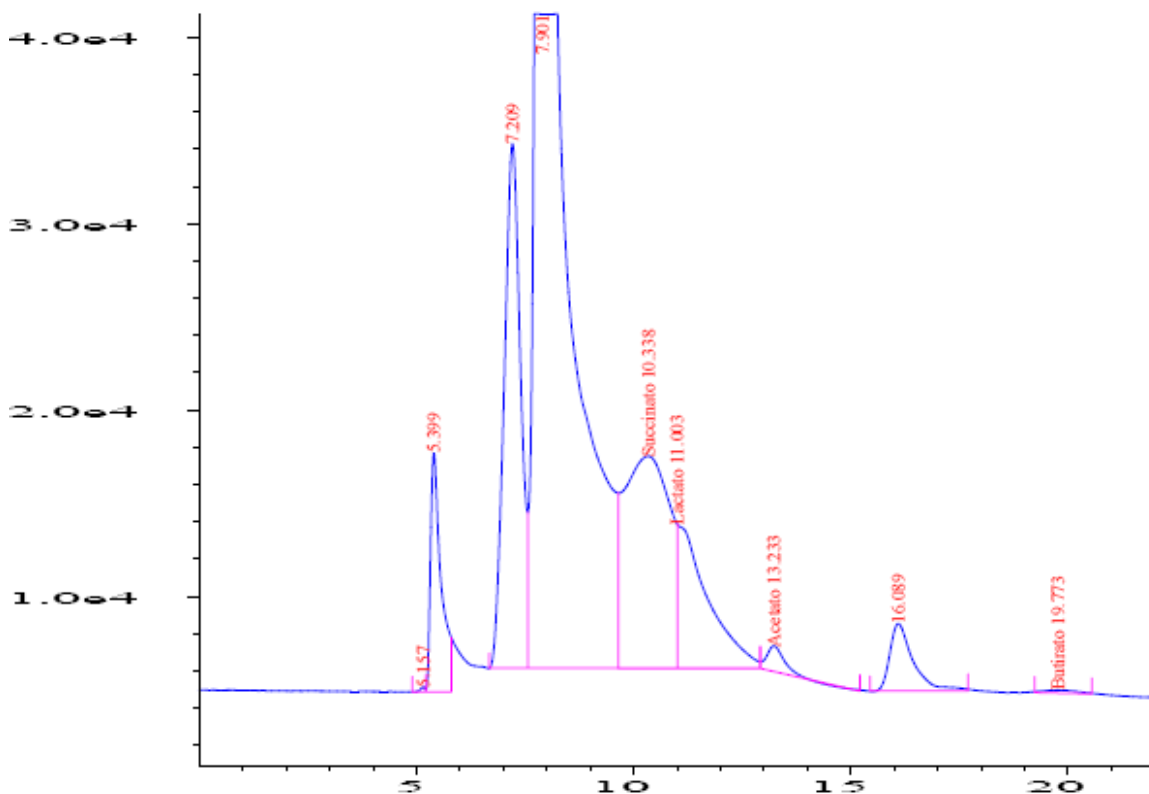
```

Data File Name   : C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-310010.D
Operator        : Marcelo Anaerobios
Instrument       : ANALYZER1
Sample Name     : Amostra 31
Run Time Bar Code:
Acquired on    : 30 Jun 07 00:39 AM
Report Created on: 03 Jul 07 00:24 AM
Last Recalib on : 07 MAY 04 06:02 PM
Multiplier     : 1
Page Number    : 1
Vial Number    : 1
Injection Number:
Sequence Line :
Instrument Method: HILARIO.MTH
Analysis Method : HILARIO.MTH
Sample Amount  : 0
ISTD Amount    :
  
```

Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-310010.D

Ret Time	Area	Type	Width	Ref#	mM	Name
10.212	1050773	HH	1.080	1	129.701	Succinato
11.190	451245	HH R	0.607	1	61.409	Lactato
12.232	* not found *			1		Formato
13.248	7563	MM T	0.433	1	4.300	Acetato
15.690	* not found *			1		Propionato
18.636	* not found *			1		Etanol
19.330	* not found *			1		Butirato

Análise em HPLC do sobrenadante Isolado LBBMA283 crescido em meio MM reduzido com  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de ditioneitol. A bactéria foi incubada estaticamente a  $30^\circ \text{C}$  até atingir a fase estacionária de crescimento.



External Standard Report

```

Data File Name   : C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-340011.D
Operator        : Marcelo Anaerobios
Instrument       : ANALYZER1
Sample Name     : Amostra 34
Run Time Bar Code:
Acquired on    : 30 Jun 07 01:02 AM
Report Created on: 03 Jul 07 00:27 AM
Last Recalib on : 07 MAY 04 06:02 PM
Multiplier     : 1
Page Number    : 1
Vial Number    : 1
Injection Number:
Sequence Line :
Instrument Method: HILARIO.MTH
Analysis Method: HILARIO.MTH
Sample Amount  : 0
ISTD Amount    :
  
```

Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\ANAEAL-1\P-340011.D

Ret Time	Area	Type	Width	Ref#	mM	Name
10.338	827980	MM T	1.210	1	102.331	Succinato
11.003	373853	MM T	0.564	1	51.084	Lactato
12.232	* not found *	*	*	1		Formato
13.233	37264	MM T	0.451	1	10.887	Acetato
15.690	* not found *	*	*	1		Propionato
18.636	* not found *	*	*	1		Etanol
19.773	8756	MM T	0.898	1	0.940	Butirato