

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**EM BIOTECNOLOGIA-PPGBIOTEC**

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR BACTÉRIAS**  
**DEGRADADORAS DE PETRÓLEO ISOLADAS DE ISÓPTEROS DA**  
**FLORESTA AMAZÔNICA NO MUNICÍPIO DE COARI.**

**ROSICLÉIA PEREIRA DE LIMA**

**COARI-AM**

**2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**EM BIOTECNOLOGIA-PPGBIOTEC**

**PRODUÇÃO DE BIODISSURFATANTES POR BACTÉRIAS**  
**DEGRADADORAS DE PETRÓLEO ISOLADAS DE ISÓPTEROS DA**  
**FLORESTA AMAZÔNICA NO MUNICÍPIO DE COARI.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade

Co-Orientador: Prof. Dr. Josemar Gurgel da Costa

**COARI-AM**

**2018**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L732p Lima, Rosicleia Pereira de  
Produção de Biossurfactantes por bactérias degradadoras de petróleo isoladas de isópteros da Floresta Amazônica no município de Coari / Rosicleia Pereira de Lima. 2017  
91 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Edmar Vaz de Andrade  
Coorientador: Josemar Gurgel da Costa  
Dissertação (Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Biossurfactantes. 2. Isópteros. 3. Biologia dos Cupins. 4. Diagnose. I. Andrade, Edmar Vaz de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**ROSICLÉIA PEREIRA DE LIMA**

**PRODUÇÃO DE BIODISSURFACTANTES POR BACTÉRIAS  
DEGRADADORAS DE PETRÓLEO ISOLADAS DE ISÓPTEROS DA  
FLORESTA AMAZÔNICA NO MUNICÍPIO DE COARI.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade

Universidade Federal do Amazonas

---

Profa. Dra. Elen Bethleen de Souza Carvalho

Universidade Federal do Amazonas

---

Prof. Dr. Adolfo José da Mota

Universidade Federal do Amazonas

---

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a minha família, a meus filhos Blas Samuel Lima Sanchez, Ellyne Maria Lima de Lira, e ao meu amigo, auxiliador e incentivador Blas Dario Ledesma Sanchez, pessoas que não puderam contar comigo por três longos anos.

Dedico também a minha querida mãe Edite Pereira Maciel, que mesmo não tendo a oportunidade de frequentar a escola sempre acreditou que a educação mudaria a minha vida.

Dedico a meus irmãos e amigos da Escola Estadual Nossa Senhora do Perpétuo Socorro, em especial aos amigos: Ana Miles de Souza Belém, João Paulo Dantas da Costa, Gerlane Lima da Silva, Auristela Gonçalves da Costa e Alicia Gonçalves, Alberto Andrade de Lima por me proporcionarem momentos de felicidade e confiança.

A todos, meu muito obrigado!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por sua infinita bondade, misericórdia e amor por mim.

Agradeço a Universidade Federal do Amazonas, meu lar por longos anos.

Aos mestres com carinho, em especial ao Prof. Dr. Josemar Gurgel da Costa,  
que abriu mão de seu descanso para me ajudar nesta caminhada.

Prof. Dra. Maria Isabel Ovellar Heckman pelo incentivo e por plantar em mim o  
amor pela Biologia.

Prof. Dra. Ana Claudia Kaminsky pelo constante sorriso.

A meu orientador Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade, pelo direcionamento e  
aprendizagem.

A meus companheiros de jornada: Rozivete Maciel de Lima, Gerlane Lima da  
Silva, Júlio Nino Neto, Jeferson Antunes, e Ruandra Kaienny da Silva  
Laranjeira.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura Química de alguns biossurfactantes .....	23
Figura 2: Diminuição intermolecular da tensão superficial e interfacial .....	24
Figura 3. Diagrama da variação de tensão superficial e interfacial e solubilidade do composto orgânico em relação à concentração do tensoativo .....	25
Figura 4: Rainha Fisogástrica de <i>Microcerotermes subtilis</i> ; a) rainha de substituição com asas ninfais; b) Rainha real. ....	28
Figura 5: Rainha Reprodutora .....	28
Figura 6: Detalhe da sutura basal presente na asa de um cupim. ....	29
Figura 7: Castas da colônia de acordo com a função na sociedade.....	30
Figura 8: Vista ventral da cabeça de um soldado mandibulado. ....	31
Figura 9: Ciclo de vida de cupins .....	32
Figura 10: Morfologia de soldados .....	33
Figura 11: Soldado nasuto de <i>syntermes</i> sp. com suas estruturas corporais externas .....	34
Figura 12: Castas: A. Reprodutor suplementar; B. Operário; C. Soldado nasuto; D. Soldado; E. Forma alada reprodutora; F. Forma alada reprodutora logo após a perda da asa; G. Rainha fisogástrica .....	35
Figura 13: Tubo digestivo isolado do térmita australiano <i>Mastotermes darwinenses</i> . Barra 5 mm, F intestino anterior com glândulas salivares, esôfago, moela e papo; M intestino médio; MT Tubulos de Malpighi; H intestino posterior; P1 seguimento proctodeal seguido pela válvula entérica; P3 pança; P4 cólon; P5 reto (modificado de Konig 2006). ....	38
Figura 14: Separação de cupins do ninho.....	42
Figura 15: Pesagem de cupins.....	42
Figura 16: Maceração de cupins em 10 mL de BH.....	42
Figura 17: Maceração de cupins.....	42
Figura 18: Inóculos contendo meio mínimo BH e macerado de cupins.....	44
Figura 19: Cupins conservados para a identificação da espécie.....	45
Figura 20: Morfologia externa de isópteros .....	45
Figura 21: Plaqueamento em PCA após incubação de 48h da triplicata $10^{-4}$ .....	46
Figura 22: Esgotamento por meio de estrias .....	46
Figura 23: Estrias em meio PCA.....	47
Figura 24: Coloração de Gram.....	48
Figura 25: Detalhes dos arranjos celulares.....	48
Figura 26: Teste de Cápsula.....	49
Figura 27: Lâmina corada para a detecção de Cápsula .....	49
Figura 28: Criotubos contendo microrganismos conservados em Glicerol.....	49
Figura 29: Inóculos contendo microrganismos isolados .....	50
Figura 30: Pentes para a formação dos poços .....	53
Figura 31: Aplicação das amostras de Dna na Cuba .....	53
Figura 32: Halos de inibição em placa contendo os antimicrobianos .....	56
Figura 33: Formação das gotas pela adição do sobrenadante em parafilme .....	59
Figura 34: Cultivo de UPC 3 em 7 dias para a realização dos testes de redução da Tensão Superficial .....	60
Figura 35: UPC3 C no 7º dias de cultivo e seu controle .....	63
Figura 36: UPC 3 em seu 12º dias de cultivo .....	63

Figura 37: Teste de Cápsula detectando sua ausência em UPC3 A .....	65
Figura 38: Caracterização microscópica em UPC3 C .....	65
Figura 39: Caracterização microscópica em UPC3 A.....	65
Figura 40: Detalhes dos arranjos em UPC3 B.....	65
Figura 41: Teste de cápsula detectando sua presença em UPC3 C .....	66
Figura 42: Indivíduos identificados de UPC 3 .....	67
Figura 43: Cupins da família Termitidae presentes em UPC3 C .....	67
Figura 44: Detalhes da morfologia dos Termitidae presente em UPC3 C .....	68
Figura 45: Desenho esquemático para identificação de Termitidae.....	68
Figura 46: Detalhes mostrando na margem inferior o halo obtido no disco antimicrobiano de CAZ 30 por <i>Psychrobacillus psychrodurans</i> .....	70
Figura 47: Gráfico do perfil de Crescimento Microbiano .....	71
Figura 48: Frascos em repouso após agitação em vortex .....	72
Figura 49: Gráfico de Hidrofobicidade Celular e desvio padrão .....	73
Figura 50: Alturas da emulsão formada em experimental contendo sobrenadante e solvente Hexano	74
Figura 51: Alturas da emulsão formada em experimental contendo sobrenadante e solvente Xileno..	74
Figura 52: Controles.....	75
Figura 53: Gráfico obtido através do teste de Atividade Emulsificante.....	75
Figura 54: Tamanho das gotas do sobrenadante em comparação ao controle SDS .....	76
Figura 55: Gráfico referente aos valores de Redução da Tensão Superficial.....	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Biossurfactante e microrganismos produtor .....	20
Tabela 2: Denominação preliminar, habitats e coordenadas geográficas das coletas de isópteros.....	41
Tabela 3: Denominação preliminar, habitat, composição do meio. ....	43
Tabela 4: Iniciadores utilizados na PCR.....	54
Tabela 5: Reagentes utilizados .....	54
Tabela 6: Etapas, evento, temperatura e tempo .....	55
Tabela 7: Produção de Biossurfactantes em função do tempo .....	62
Tabela 8: Denominação e Caracterização macroscópicas das colônias .....	64
Tabela 9: Resultado da Coloração de Gram em alguns microrganismos .....	64
Tabela 10: Resultado em relação ao tamanho do halo .....	69
Tabela 11: Valores de Hidrofobicidade Celular baseado no teste de Tukey.....	72
Tabela 12: Valores da Atividade Emulsificante pelo teste de Tukey.....	74
Tabela 13: Valores de redução da Tensão Superficial baseado no teste de Tukey .....	76
Tabela 14: Valores obtidos no teste de Atividade Emulsificante.....	88
Tabela 15: Atividade Emulsificante utilizando o teste de Tukey.....	89
Tabela 16: Hidrofobicidade Celular utilizando o teste de Tukey.....	89
Tabela 17: Teste de Tukey em valores de Redução da Tensão Superficial .....	90
Tabela 18: Valores de Tensão Superficial obtida nos tempos 1, 7 e 12 dias de cultivo de <i>Psychrobacillus psychrodurans</i> .....	90
Tabela 19: Tabela com os valores obtidos dos halos em disco Antibiograma Gram Negativo de <i>Psychrobacillus psychrodurans</i> .....	91

## **LISTA DE SIGLAS**

BH - Bushnell Hass Broth

CMC – Concentração Milenar Crítica

LB - Luria-Bertani

MMM - Meio mineral mínimo

MN/m - Mili Newton por metro

PCA - Ágar para contagem de placa

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TS – Tensão Superficial

## RESUMO

A presente dissertação relaciona isópteros da floresta amazônica, petróleo e biossurfactantes. Os isópteros foram alvo desta investigação por viverem em associação a inúmeros microrganismos como bactérias, protozoários flagelados dentre outros que conferem a eles a incrível habilidade em degradar material ligno-celulósico presente em sua principal dieta alimentar: a madeira. A lignina e o petróleo possuem estrutura química composta por anéis aromáticos ou seja os HPAs que conferem a estes compostos recalcitrância e resistência a biodegradação. Microrganismos biodegradadores de petróleo possuem algumas habilidades que facilitam o processo de biodegradação, e uma das estratégias utilizadas é a liberação no meio extracelular de biossurfactantes, que atuam reduzindo a tensão superficial e interfacial das moléculas ocasionando desta forma a biodegradação de compostos hidrofóbicos. Cupins foram coletados na cidade de Coari, de habitat solo e árvore seguindo para o cultivo de consórcio produtor de biossurfactante em meio mínimo e petróleo como única fonte de carbono, posteriormente os microrganismos pertencentes ao consórcio selecionado foram cultivados individualmente, e o microrganismo com maior potencial foi identificado pelo sequenciamento do gene RNA ribossomal 16 S revelando a bactéria *Psychrobacillus psychrodurans*. Testes realizados como Atividade Emulsificante e Hidrofobicidade Celular revelaram através de análise estatística diferenças significativas nos experimentos envolvendo os solventes Hexano, xileno e petróleo em sete dias de cultivo. No teste de detecção de produção de biossurfactante (colapso de gota) a gota formada pelo sobrenadante livre de células evidenciou a produção de biossurfactante de 0,1 % comparado ao surfactante SDS. A redução da tensão superficial através do método do anel de Du Noyu em tensiometro Kruss foi comprovada utilizando o sobrenadante bacteriano em tempos de cultivo distintos 1, 7 e 12 dias, e apontaram a redução da tensão superficial de 72 mN/m<sup>2</sup> para aproximadamente 54,6 mN/m<sup>2</sup> em sete dias de cultivo.

## **ABSTRACT**

The present dissertation relates isoptera of the Amazonian forest, oil and biosurfactants. The isoptera were the target of this investigation because they live in association with innumerable microorganisms such as bacteria, flagellated protozoa among others that give them the incredible ability to degrade ligno-cellulosic material present in their main diet: wood. Lignin and petroleum have a chemical structure composed of aromatic rings, ie the PAHs that give these compounds recalcitrance and resistance to biodegradation. Biodegradable petroleum microorganisms have some abilities that facilitate the biodegradation process, and one of the strategies used is the release into the extracellular environment of biosurfactants, which act to reduce the surface and interfacial tension of the molecules, thus causing the biodegradation of hydrophobic compounds. Termites were collected in the city of Coari, from soil habitat and tree followed for the cultivation of consortium producing biosurfactant in minimal medium and oil as the only source of carbon, later the microorganisms belonging to the selected consortium were grown individually, and the microorganism with the highest potential was identified by the sequencing of the 16 S ribosomal RNA gene revealing the bacterium *Psychrobacillus psychrodurans*. Tests performed as Emulsifying Activity and Cell Hydrophobicity revealed statistical differences in the experiments involving Hexane, xylene and petroleum solvents in seven days of culture. In the detection test of biosurfactant production (droplet collapse) the drop formed by the cell-free supernatant evidenced the production of biosurfactant of 0.1% compared to the SDS surfactant. The reduction of the surface tension by the Du Noyu ring method in Kruss tensiometer was demonstrated using the bacterial supernatant at distinct cultivation times 1, 7 and 12 days and indicated a reduction of the surface tension of 72 mN / m<sup>2</sup> to approximately 54, 6 mN / m<sup>2</sup> in seven days of cultivation.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	15
2.	OBJETIVOS .....	17
2.1.	Objetivo Geral .....	17
2.2.	Objetivos Específicos .....	17
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
3.1.	Biossurfactantes: Definição .....	18
3.1.1.	Tipos de Biossurfactantes, Organismos produtores e Classificação .....	19
3.1.2.	Composição e natureza química dos biossurfactantes .....	22
3.1.3.	Funções dos Biossurfactantes .....	23
3.2.	Isópteros .....	26
3.2.1.	Biologia dos Cupins .....	29
3.2.2.	Diagnose .....	31
3.2.3.	Morfologia .....	32
3.2.4.	Hábitos Alimentares .....	35
3.2.5.	Microrganismos associados aos isópteros .....	37
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	41
4.1.	Coleta dos Isópteros .....	41
4.2.	Tratamentos iniciais e Introdução do macerado de cupins em meio Mineral Mínimo BH 41	
4.3.	Produção de Biossurfactantes em consórcio .....	44
4.4.	Seleção da coleta com microrganismos com potencial produtor de Biossurfactantes ..	44
4.5.	Identificação e classificação das espécies de cupins .....	45
4.6.	Técnicas utilizadas para a obtenção de linhagens bacterianas .....	45
4.6.1.	Técnica de Diluição Seriada e Esgotamento em Estrias nos meios PCA .....	45
4.8.	Preservação de Microrganismos em Glicerol .....	49
4.9.	Teste individual de produção de Biossurfactantes .....	50
4.10.	Identificação Molecular .....	50
4.10.1.	Preparo do Lisado Celular .....	51
4.10.2.	Ligação do Dna .....	51
4.10.3.	Lavagem do DNA .....	52
4.10.4.	Eluição do Dna .....	52
4.10.5.	Análise de Dna por eletroforese em gel de Agarose .....	52
4.10.6.	Procedimentos para a Eletroforese .....	53
4.10.7.	Reação em cadeia Polimerase (PCR) e amplificação genica utilizando Primer 16 S ...	53

4.11.	Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos .....	55
4.12.	Perfil de Crescimento Microbiano .....	56
4.13.	Teste de Atividade Emulsificante.....	57
4.14.	Teste de Hidrofobicidade Celular.....	58
4.15.	Teste de detecção da produção de Biosurfactante (colapso de gota).....	58
4.16.	Teste da redução da Tensão Superficial .....	59
4.17.	Tratamentos Estatísticos.....	61
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	62
5.1.	Caracterização macroscópicas, microscópicas, e presença de cápsula do consórcio UPC 3	63
5.2.	Identificação de cupins pertencentes à UPC 3 .....	67
5.3.	Seleção de UPC3 C como consórcio microbiano produtor de Biosurfactante .....	68
5.4.	Identificação Molecular de UPC3 C .....	68
5.5.	Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos de <i>Psychrobacillus psychrodurans</i> .....	69
5.6.	Perfil de Crescimento Microbiano de <i>Psychrobacillus psychrodurans</i> .....	71
5.7.	Teste de Hidrofobicidade Celular.....	72
5.8.	Avaliação da produção de Biosurfactante através da Atividade Emulsificante de sobrenadante da cultura bacteriana de <i>Psychrobacillus psychrodurans</i> .....	73
5.9.	Detecção de produção de Biosurfactante (Colapso de Gota).....	75
5.10.	Teste de Redução da Tensão Superficial.....	76

## 1. INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são metabólitos biológicos produzidos por uma variedade de microrganismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras, (Tonini, Rezende e Gravitól, 2010). São moléculas anfipáticas (ou anfifílicas) que apresentam uma porção polar (hidrofílica) e uma apolar (hidrofóbica). A maioria dos biossurfactantes conhecidos é sintetizada por microrganismos cultivados em hidrocarbonetos imiscíveis em água, mas alguns são produzidos em substratos solúveis como glicose, glicerol e etanol. (Matsuura, 2004).

Suas principais características abrangem a detergência, emulsificação, solubilização e diminuição da tensão superficial e interfacial entre ar-água e ar-óleo. Desempenham a função natural de degradar compostos hidrofóbicos, aumentando a área superficial das gotas de óleo, permitindo o acesso de microrganismos ao substrato pela biodisponibilização dos compostos para a biodegradação microbiana e, conseqüentemente, aumentando sua biomassa (Tonini, Rezende e Gravitól, 2010).

Processos químicos resultam na produção de surfactantes sintéticos. Estes sintéticos são amplamente utilizados em todos os setores das indústrias modernas, (Matsuura, 2004). Como exemplos, destacam-se nas indústrias de detergentes, têxtil e atualmente ganhando grande ênfase em aplicações no campo da Biorremediação de compostos de petróleo e seus derivados (Silva, 2012).

A produção de biossurfactantes por microrganismos vem revolucionando vários processos onde são empregados, pois substituem os surfactantes produzidos quimicamente (sintéticos). De acordo com Tonini, Rezende e Gravitól (2010), surfactantes sintéticos constituem uma vasta aplicação em processos industriais principalmente na indústria petrolífera, pois vem desempenhando importante contribuição em limpeza de derramamento, recuperando também petróleo em reservatórios. No entanto surfactantes sintéticos apresentam toxicidade e não são biodegradáveis. Os biossurfactantes possuem vantagens em comparação aos sintéticos, pois apresentam baixa toxicidade, possuem natureza biodegradável, são eficazes nas variações de temperatura, pH, salinidade e facilidade de síntese (Silva, 2012; Santos, et al 2014).

Diante de tais vantagens a produção de biossurfactantes por microrganismos viabilizaria o custo da produção, tornando possível uma maior aplicação na indústria e nos processos de Biorremediação. A Biorremediação é uma técnica amplamente utilizada em acidentes ambientais envolvendo derramamento de petróleo e derivados em rios, mares e etc, visa também encontrar microrganismos com capacidade de biodegradar petróleo ou de reduzir os níveis de poluição deste composto, e na procura por esta capacidade vale ressaltar que a Floresta Amazônica possui uma variedade de insetos que vivem associados a microrganismos e que evidenciam uma rápida capacidade reprodutora e alimentação proveniente de compostos altamente recalcitrantes similares ao petróleo, dentre estas se destacam os cupins ou térmitas.

Os cupins denominados xilófagos alimentam-se exclusivamente de madeira em diversos estágios, esta capacidade é atribuída aos microrganismos associados a eles que residem em seu trato digestório e degradam a lignina presente na madeira. A lignina por sua vez possui estrutura química composta por anéis aromáticos assim como os HPAs presentes no petróleo, e a produção de biossurfactante ocorre na presença destes compostos, deste modo uma investigação que procure reproduzir o processo natural de degradação de aromáticos visando a produção de biossurfactante por bactérias provenientes de cupins trazem novas perspectivas as aplicações industriais e principalmente em técnicas de Biorremediação que são empregadas nos acidentes ambientais envolvendo derramamento de petróleo em rios, mares e efluentes.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

- Produzir biossurfactante utilizando bactérias biodegradadoras de petróleo associadas a cupins da Floresta Amazônica.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Identificar espécies de cupins que vivem em associação a microrganismos produtores de biossurfactantes;
- Identificar o microrganismo mais eficiente na produção de biossurfactantes entre as linhagens bacterianas presentes em isópteros coletados na Região Amazônica através da identificação molecular 16S;
- Realizar teste de antibiograma, a fim de se conhecer a sensibilidade ou resistência a antibióticos;
- Conhecer as fases lag, exponencial (log), e estacionária do microrganismo selecionado através do perfil de crescimento microbiano;
- Realizar testes de Atividade Emulsificante do microrganismo selecionado;
- Realizar testes de Hidrofobicidade celular;
- Realizar testes de produção de Biossurfactantes e compará-los a surfactantes sintéticos disponíveis comercialmente;
- Determinar a taxa de redução da tensão superficial através do uso do tensiômetro pelo método do anel de Du Noyu.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Biossurfactantes: Definição

Biossurfactantes é o nome designado a compostos biológicos anfífilos, ou seja, são metabólitos que possuem uma porção apolar (não interagem com a água) e uma porção polar (interage com a água). São produzidos por uma série de microrganismos como, bactérias, arqueas, leveduras e fungos filamentosos e esta produção associa-se ao consumo de substratos insolúveis em água (Bueno, 2008). Geralmente microrganismos produtores de Biossurfactantes são encontrados em locais onde há concentração de petróleo e derivados como: postos de gasolina, locais acidentalmente contaminados e no próprio petróleo ou asfalto (borra), (Matsuura, 2004).

Segundo Matsuura (2004), os primeiros relatos acerca da descoberta dos biossurfactantes datam da década de 60 onde são citados como compostos extracelulares anfipáticos em pesquisas relacionadas à fermentação de hidrocarbonetos. Inicialmente a atividade microbiana foi o foco principal que despertou o interesse na produção de biossurfactantes. Os Ramnolipídeos e Surfactina são os biossurfactantes mais estudados e conhecidos devido sua ação antibiótica e foram primeiramente descritos na literatura em 1949 e 1968. (Matsuura, 2004; Silva, 2012).

Os biossurfactantes geralmente são sintetizados por microrganismos cultivados na presença de hidrocarbonetos, porém alguns são produzidos em substratos solúveis como glicose, glicerol e etanol (Tonini, Rezende, Gravitól, 2010), ou em substratos alternativos como melão, soro de leite ou mesmo resíduos provenientes de destilaria (Matsuura, 2004). Devido a sua natureza anfífilica costumam se acumular nas interfaces (ar-água e óleo-água) desempenhando diversas funções naturais onde uma delas consiste na diminuição da tensão entre essas faces, esta ação é possível devido um desbalanço entre as forças de coesão superficial e interfacial, ocasionando à degradação de compostos hidrofóbicos. Quando isto ocorre há um aumento na área superficial das gotas de óleo facilitando o acesso das bactérias ao substrato, aumentando sua biomassa (Tonini, Rezende e Gravitól, 2010).

Quando são produzidos por processos químicos, ou seja, sinteticamente, recebem o nome de Surfactantes e são popularmente conhecidos como detergentes e sabões. São amplamente utilizados na indústria moderna, onde suas funções naturais são exploradas gerando grande interesse econômico. Seu uso industrial estende-se a diversas áreas como a

Indústria do óleo (Matsuura, 2004), produtos de limpeza, cosméticos e higiene (Nitschke & Pastore, 2002),

Já os biossurfactantes, que recebem este nome por serem produzidos por microrganismos, desempenham importante contribuição no ramo da Biorremediação. Nesta abordagem vem atuando na limpeza de impactos como derramamentos de petróleo e derivados. Apesar de suas características favoráveis em diversos setores os surfactantes são vistos negativamente no ramo da Biorremediação, pois podem apresentar toxicidade, contaminando e impedindo a germinação de espécies nativas, além de não serem biodegradáveis, tais fatores estimulam a busca por microrganismos capazes de produzirem biossurfactantes e contribuir nos processos de Biorremediação. Bueno (2008) cita que os biossurfactantes por não afetarem o meio ambiente são uma alternativa aos surfactantes sintéticos convencionais.

Os biossurfactantes mais conhecidos e suas funções segundo Matsuura (2004) são: Surfactina relacionada com a formação do corpo de frutificação de *Bacillus subtilis*; Ramnolipídeo de *Pseudomonas aeruginosa* relacionada à formação de biofilme e a Streptofactina com a formação de micélio aéreo em *Streptomyces tendae*.

Entre os surfactantes sintéticos destacam-se o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), Brometo de Cetiltrimetilamônio e Tween 20 (Matsuura, 2004).

### **3.1.1. Tipos de Biossurfactantes, Organismos produtores e Classificação**

Os variados tipos de biossurfactantes são classificados de acordo com os seguintes critérios: maior grupo funcional, HBL - balanço hidrofílico-hidrofóbico (Bueno, 2008) e microrganismo produtor (Matsuura, 2004).

Bueno (2008) classifica os biossurfactantes em cinco categorias:

- Glicolipídeos: também são denominados Cerebrosídeos e Gangliosídeos, são carboidratos que aparecem em combinações de ácidos alifáticos de cadeia longa ou com hidroxilas. Estão envolvidos na entrada de hidrocarbonetos de polaridade baixa nas células microbianas. Segundo Marzzoco & Torres (2007) os Glicolipídeos contém açúcares hidrofílicos, que podem não apresentar carga (glicose e galactose) ou apresentar carga positiva devido à presença de grupo amino.

- Lipossacarídeos: é um bioemulsificante extracelular, o emulsan é um exemplo típico desta classe. É produzido pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* e apresenta alto peso molecular e solubilidade em água;
- Lipopeptídeos: apresentam eficácia na redução da tensão superficial e interfacial. Um exemplo considerável é a Surfactina produzida *Bacillus subtilis* e destaca-se por ser o biossurfactante mais potente já relatado (Matsuura, 2004)
- Fosfolipídeos: são componentes essenciais nas membranas celulares e estão presentes em todos os microrganismos, possui duas moléculas de ácido graxo ligada a um glicerol que por sua vez está ligada a um grupo fosfato (Silva, 2012). Quando colocados em água formam uma bicamada lipídica, na qual os grupamentos fosfatos ionizados hidrofílicos estão em contato com a água e a cadeia de hidrocarbonetos apolares de ácidos graxos está voltada a parte interna da bicamada (Pelczar, Chan & Krieg, 1997). No entanto possui poucos exemplos de produção extracelular. Os mais conhecidos são produzidos pelo microrganismo *Corynebacterium lepus*;
- Ácidos graxos e lipídeos neutros: são de caráter hidrofóbico, como o ácido ustilágico e os ácidos corinomicólicos.

Animais, plantas e microrganismos são produtores de biossurfactantes, no entanto os microrganismos se destacam por apresentarem o menor tempo de geração viabilizando maior produção em curto espaço de tempo. Em cultura de microrganismos a maior quantidade de biossurfactantes é liberada na fase exponencial de crescimento (Matsuura, 2004).

Ambientes contaminados com hidrocarbonetos como solo, água, mar e sedimentos marinhos possuem uma infinidade de microrganismos produtores de biossurfactantes. Um estudo realizado por Bodour, Drees & Maier (2003) mostrou que 21 tipos de solos (não contaminados, contaminados com hidrocarbonetos e metais concomitantemente) 20 continham ao menos um microrganismo produtor de biossurfactantes. (Matsuura, 2004). A tabela 01 destaca alguns exemplos de biossurfactantes e seus respectivos produtores.

Tabela 1: Biossurfactante e microrganismos produtor

MICRORGANISMO PRODUTOR	TIPO DE BIOSSURFACTANTE
<i>Candida lipolytica</i>	“Liposan”
<i>Candida petrophilum</i>	Peptidolipídeo

<i>Candida Tropicalis</i>	Complexo ácido graxo-polissacarídeo
<i>Torulopsis bombicola (Candida)</i>	Soforolípídeo
<i>Torulopsis petrophilum</i>	Glicolípídeo e/ou proteína
<i>Bacillus subtilis</i>	Lipoproteína (surfactin)
<i>Acinetobacter calcoaceticus RAG-1</i>	Lipoheteropolissarídeo (Emulsan)
<i>Acinetobacter sp H01-N</i>	Ácidos graxos, mono e diglicerídios
<i>Arthrobacter</i>	Glicolípídeo
<i>Arthrobacter paraffineus</i>	Glicolípídeos sacarose e frutose
<i>Bacillus licheniformis</i>	Lipoproteína (lichenysin)
<i>Corynebacterium hydrocarboclastus</i>	Complexo proteína-polissacarídeo
<i>Corynebacterium lepus</i>	Ácidos corinomicólicos
<i>Corynebacterium salvonicum SFC</i>	Lípídeo neutro
<i>Nocardia erythropolis</i>	Lípídeos neutros
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ramnolípídeo
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipopeptídeo
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Trealose dimicolatos
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Fosfolípídeo
<i>Aspergillus sp.</i>	Fosfolípídeo
<i>Streptomyces tendae</i>	Streptofactina
<i>Flavobacterium sp.</i>	Flavolípídeos

Fonte: Matsuura (2004)

O tipo de biossurfactante produzido depende do microrganismo produtor, alguns microrganismos já são descritos como produtores de determinados tipos de biossurfactantes. Biossurfactantes do tipo Ramnolípídeos, trealolípídeos, e lipopeptídeo são produzidos por bactérias, já biossurfactantes do tipo soforolípídeos e manosileritritolípídeos são sintetizados por leveduras, e fungos filamentosos produzem ácidos do tipo ustilágico e manosileritritolípídeos (Matsuura, 2004).

Biossurfactantes produzidos por microrganismos procariontes ou eucariontes possuem diversas estruturas químicas que podem ter baixo ou alto peso molecular. Os que apresentam baixo peso são geralmente Glicolípídeos (Matsuura, 2004), e os de alto peso molecular são representados pelos Biopolímeros e estão relacionados à produção de emulsão (Bueno, 2008).

### 3.1.2. Composição e natureza química dos biossurfactantes

São moléculas anfifílicas e apresentam estruturas químicas diferenciadas, possuem uma fração polar (mono, oligo ou polissacarídeos, ou proteínas) e uma fração apolar (ácido graxo, hidroxilados e álcoois graxos que podem apresentar ou não saturação) apresentando também alto e baixo peso molecular (Bueno, 2008).

Nitschek & Pastore (2002) relatam sobre a estrutura comum entre os biossurfactantes. Segundo eles a composição lipofílica consiste em uma cadeia hidrocarbônica contendo um ou mais ácidos graxos, podendo apresentar saturação, insaturações, hidroxilas ou mesmo ramificações ligadas à composição hidrofílica, que geralmente consiste num éster, um grupo hidroxil, fosfato, carboxilato ou carboidrato (Silva, 2012).

Os biossurfactantes podem apresentar variabilidade no tamanho de sua molécula, podem se apresentar como um simples ácido graxo ou até mesmo estruturas poliméricas, podendo também ser neutros ou aniônicos.

Basicamente a composição centesimal da molécula de biossurfactante pode ser composta por uma proteína, carboidratos ou lipídios. Segundo Silva, (2012) a composição de um biossurfactante está caracterizada por proteínas (peptídeos) neutras ou aniônicas associada a ácido graxo e os aminoácidos tendem a se organizar formando estruturas cíclicas.

Já os biossurfactantes com estruturas poliméricas abrangem diversos grupos químicos envolvidos, como o emulsan (Figura 01) que apresenta um ácido graxo ligado a um esqueleto de heteropolissacarídeos, ou mesmo o liposan biossurfactante composto por carboidratos e proteínas (Nitschek & Pastore, 2002).

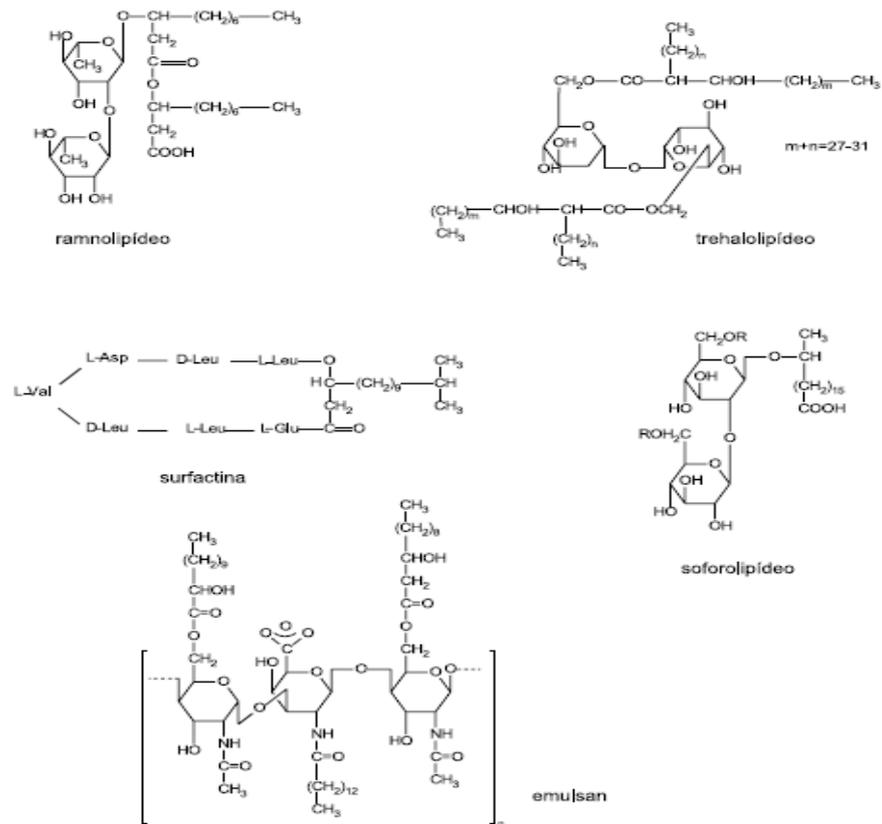


Figura 1: Estrutura Química de alguns biossurfactantes

Fonte: Nitschke & Pastore (2002)

### 3.1.3. Funções dos Biossurfactantes

As funções dos biossurfactantes em sua totalidade ainda são desconhecidas. No entanto algumas delas já estão bem definidas e destacam-se em diversas aplicações:

- Redução da tensão interfacial e superficial de compostos hidrofóbicos (Bueno, 2008);
- Emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos e compostos insolúveis em água (Nitschke & pastore 2002);
- Aumento da biomassa de microrganismos biodegradadores em substratos hidrofóbicos (Tonini, Rezende e Gravitól, 2010);
- Transporte de hidrocarbonetos através da parede celular de alguns microrganismos (Nitschke & Pastore 2002).
- Aderência e liberação de células da superfície dos substratos, facilitando a colonização de nichos ecológicos favoráveis (Nitschke & Pastore 2002);

- Atividade antibiótica possibilitando maiores chances de sobrevivência e competitividade de nutrientes (Matsuura, 2004; Silva, 2012).

As funções naturais dos biossurfactantes compreendem principalmente a sua atividade surfactante, dispersante e emulsificante. Estas ações resultam na redução das forças de repulsão entre fases diferentes. Compostos altamente hidrofóbicos apresentam maior dificuldade de biodegradação e possuem tensão superficial e interfacial altas, onde as moléculas permanecem bem próximas. Quando a tensão superficial é reduzida, ocorre aumento na repulsão, e esta na repulsão faz com que a área superficial das gotas de óleo aumente permitindo o acesso de microrganismos e consequentemente misturando as fases com maior facilidade (Matsuura, 2004).

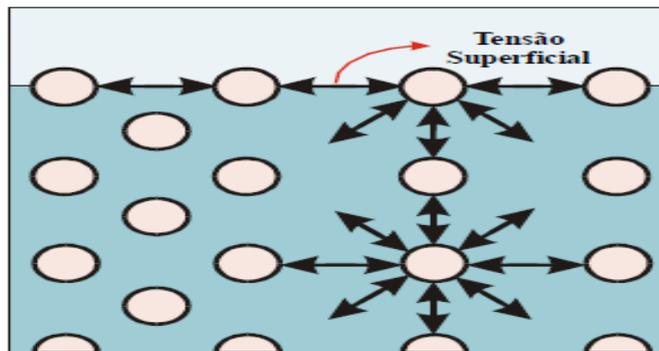


Figura 2: Diminuição intermolecular da tensão superficial e interfacial  
Fonte: Piróllo, 2006

Por apresentarem diferentes estruturas químicas suas funções podem ser empregadas em distintas aplicações, e uma generalização acerca das funções se torna inviável. Como exemplo surfactantes de alto peso molecular atuam como dispersantes, impedindo a junção das gotas de óleo. No entanto Matsuura (2004) e Silva (2012) citam três hipóteses acerca das funções do biossurfactantes: aumentar a área superficial de substratos hidrofóbicos; aumentar a biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos e regular a fixação e a liberação do microrganismo de superfície.

Sua ação emulsificante torna possível o contato direto do microrganismo biodegradador ao composto insolúvel em água, ajudando na dispersão do óleo e liberando a bactéria do substrato (Matsuura, 2004). Quando emulsões estáveis de óleo em água (O/A) se formam, diluem as gotas do óleo na água disponibilizando seus componentes químicos para que os microrganismos tenham acesso aos nutrientes (Silva, 2012).

Segundo Bueno (2008) as moléculas biossurfactantes possuem duas propriedades fundamentais: saem das soluções e direcionam-se as interfaces (ar/líquido, líquido/líquido) fenômeno denominado adsorção e formam agregados orientados, conhecidos como micelas. Suas formações em solução conferem-lhe as propriedades de detergência e solubilização.

As micelas são um agregado de monômeros de surfactantes e se formam em uma determinada concentração de tensoativos ou CMC - Concentração Micelar Crítica (Silva, 2012), quando há um aumento na concentração destes tensoativos os monômeros se agregam nas interfaces formando micelas desfavorecendo a relação entre a fração apolar e as moléculas de água. Nestas a fração apolar concentra-se no interior da estrutura e a parte polar interage com o solvente.

Segundo Marzzoco & Torres (2007) os lipídeos anfipáticos, quando são adicionados a um meio líquido, se organizam espontaneamente em estrutura plurimolecular. BUENO (2008) cita que em concentrações acima da CMC, o surfactante consegue aumentar a solubilidade de compostos orgânicos cuja solubilidade em água é baixa, uma vez que o composto orgânico é incorporado no interior da micela.

A eficiência de um biossurfactantes está relacionada com sua capacidade em reduzir a tensão superficial onde uma das fases é gasosa (Matsuura, 2004), e baixa CMC, ou seja, pouca quantidade de biossurfactantes é requerida para o declínio da tensão superficial. Esta redução traz a molécula para a superfície através de um surfactante, com esta ação a tensão superficial é reduzida. O aumento de compostos hidrofóbicos na fase aquosa indica esta redução, neste ponto a concentração é superior a CMC, e isto é alcançado pela formação de emulsão e solubilização do óleo/água (Bueno, 2008).

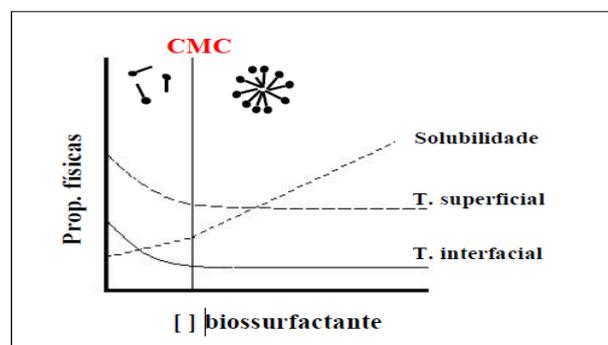


Figura 3. Diagrama da variação de tensão superficial e interfacial e solubilidade do composto orgânico em relação à concentração do tensoativo  
Fonte: Bueno (2008)

Silva, (2012) ressalta que a concentração micelar crítica (CMC) dos biossurfactantes varia entre 1-2000 mg/L, enquanto que a tensão interfacial (óleo/água) e superficial fica em torno de 1 e 30 mN/m (miliNewton/metro).

Os biossurfactantes também são alvos de grande interesse ecológico e social. Acidentes com derramamento de petróleo se tornam catástrofes com danos irreparáveis ao meio ambiente. A ação dispersante e emulsificante são capazes de facilitar a biodegradação de compostos do petróleo, uma vez que aumentam a interação superficial acelerando a degradação de vários óleos por microrganismos (Silva, 2012). Matsuura (2004) cita que outras aplicações incluem Biorremediação e dispersão de derramamento de óleo em solo e no mar, remoção do lodo de óleo de tanques de estocagem e aumento da recuperação de óleo. Bueno (2008) ressalva que todos esses devem ser estabelecidos previamente em laboratório antes de serem executados ensaios de campo.

### **3.2. Isópteros**

São insetos sociais que vivem em ninhos e organizam-se em castas trabalhando em conjunto para a manutenção da colônia. Segundo Constantino (2012) cupins pertencem à ordem dos isópteros, palavra grega que denota igualdade nas asas. Alados também são chamados de siriris ou aleluias.

Os cupins são conhecidos principalmente como pragas, pois degradam madeira morta ou em diversos estágios de decomposição, no entanto apenas 10 % dos cupins possuem essa capacidade, são os chamados xilófagos. Os demais são alimentados pelos operários com saliva, material regurgitado ou excreções do proctodeo (Lima & Leonardo, 2007).

Sua origem ainda é muito discutida entre pesquisadores, alguns defendem a ideia de que os cupins são descendentes de baratas, pois possuíam hábitos idênticos a *Cryptocercus* e não de *Problattodea*. Outros acreditam que os Isópteros principalmente o gênero *Mastodermes*, que provavelmente evoluíram de *Pycnoblattina* (Zanetti et al, 2009).

Vivem em ninhos (cupinzeiros) subdivididos em câmaras que podem ser de tamanhos variados, esses ninhos são construídos pela junção de partículas do solo, fezes e saliva. Constantino (2012) enfatiza que os cupins podem cavar túneis profundos para buscar material argiloso para a construção do ninho, que frequentemente tem proporção de areia e argila diferente do solo superficial. Esses locais possuem temperatura e umidade adequadas vindas através de um sistema de aeração construído no ninho. Nele podem viver indivíduos de ambos

os sexos, a exceção consiste na sociedade de Hymenopteros que é constituído apenas por fêmeas (Constantino et al, 2012).

Silva (2012) ressalta que os ninhos podem ser subterrâneos, epígeos ou arborícolas, e são construídos em ambiente úmido e rico em matéria orgânica, armazenando representantes de todas as classes de fungos. O tipo de habitat varia conforme a espécie. Já Constantino et al, (2012) cita que:

- Ninhos subterrâneos são: a) difusos, com um simples conjunto de túneis escavados e revestidos com material fecal; b) intermediários, consistindo em conjunto concentrado de túneis e galerias sem limite discreto; c) ninhos discretos envolvidos por uma parede contínua, como em *Cyranotermes timuassu* e *Procornitermes lespesii*.
- Ninhos epígeos: Geralmente se iniciam com uma fase subterrânea, que cresce em direção à superfície.
- Ninhos arborícolas: geralmente se iniciam em alguma fresta na casca da árvore onde o casal reprodutor se instala.

As maiores concentrações de espécies conhecidas de cupins situam-se na região neotropical, Etiópia e oriental, e estão espalhados desde florestas úmidas a regiões áridas. São insetos antigos e suas habilidades foram indispensáveis no processo evolutivo. Segundo Constantino et al (2012) os fósseis mais antigos datam do Cretáceo, com cerca de 130 milhões de anos.

Estima-se que existam cerca de 2900 espécies descritas no mundo, distribuídas em sete famílias: Mastotermitidae, Kalotermitidae, Termopsidae, Hodotermitidae, Serritermitidae, Rhinotermitidae e Termitidae. Dentre as espécies mundiais 320 são descritas no Brasil. As famílias comuns no Brasil são: Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae e Termitidae (Zanetti et al, 2009).

Lima & Leonardo (2007) os cupins pertencentes às três primeiras famílias são denominados “cupins inferiores” e os pertencentes à sétima família (Termitidae) são denominados “cupins superiores”. Os cupins inferiores possuem protozoários flagelados simbiotes, esses microrganismos conferem-lhe a capacidade de degradar e reciclar nutrientes através da trituração, decomposição, humificação e mineralização de uma variedade de recursos celulolíticos auxiliando na alimentação dos cupins de castas superiores (Zanetti et al,

2009). Neste caso os operários possuem a função de busca imediata de alimentos, e os soldados ligados à proteção do ninho e das castas férteis (Constantino et al, 2012).

Termitidae é a família que possui indivíduos com capacidades reprodutoras (rei e rainha) e demais castas (Zanetti et al, 2009). A rainha apresenta um grande desenvolvimento dos ovários tornando seu corpo enorme em comparação aos demais indivíduos, devido ao seu tamanho ela tornou-se prisioneira no ninho, além disso, possui a função de colocar mais de 200 ovos por dia. Constantino et al (2012) cita que a rainha (fêmea reprodutora) geralmente desenvolve bastante os ovários, o que resulta em considerável aumento no volume do abdômen, chamado de fisogastria, este detalhe pode ser observado na figura 04 e 05.

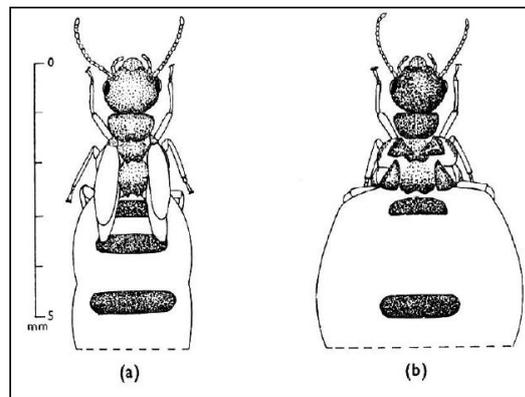


Figura 4: Rainha Fisogástrica de *Microcerotermes subtilis*; a) rainha de substituição com asas ninfais; b) Rainha real.  
Fonte: (Zanetti et al, 2009)



Figura 5: Rainha Reprodutora  
Fonte: (Zanetti et al, 2009)

Periodicamente formam-se alados (indivíduos com asas), que saem em revoada tentando fundar novas colônias, geralmente na estação chuvosa, mas esta característica é controlada por hormônios, porém este processo ainda é pouco conhecido (Constantino et al, 2012). Macho e fêmea alados encontram-se em um encontro nupcial, suas asas se quebram na

linha basal. O estreitamento da parte basal da asa e o desenvolvimento da sutura humeral ou basal são processos adquiridos durante a evolução (Zanetti et al, 2012), detalhes da sutura são mostrados na figura 06. Após este processo os cupins procuram um local apropriado para iniciar a colônia, um buraco cavado no chão ou uma fresta em madeira. O ninho começa como uma célula simples, onde o casal permanece e a fêmea coloca os primeiros ovos. A eclosão dos ovos ocorre após 15 a 80 dias, dependendo da espécie. Após algum tempo surgem os primeiros operários e a colônia começa a crescer (Constantino et al, 2012).

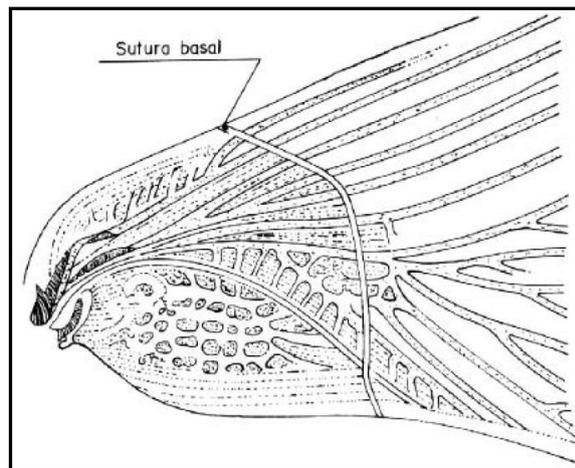


Figura 6: Detalhe da sutura basal presente na asa de um cupim.  
Fonte: (Zanetti et al, 2009).

### 3.2.1. Biologia dos Cupins

Os cupins são insetos eussociais divididos em castas (superior e inferior). Castas é o termo usado para designar os variados tipos de indivíduos e sua função dentro da colônia, todos envolvidos em um único propósito: a manutenção da colônia em termos de reprodução, proteção, alimentação e outros. Castas e funções estão representadas na figura 07.

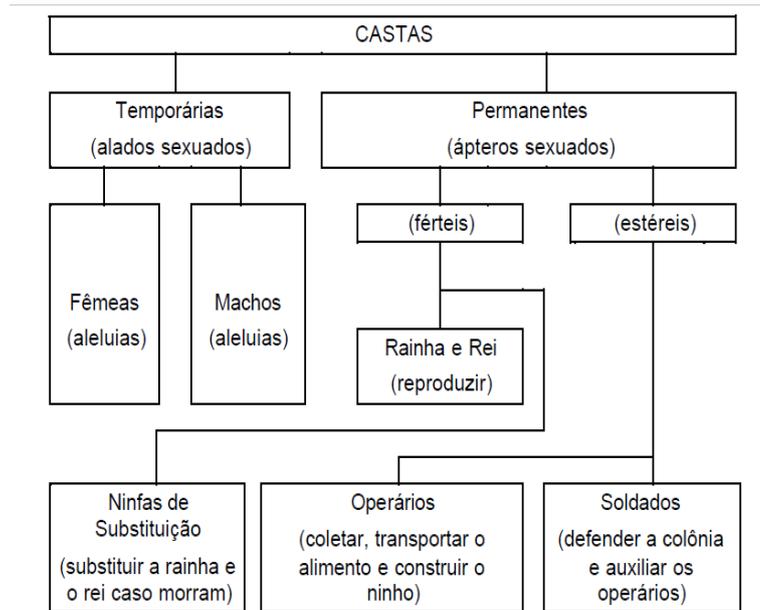


Figura 7: Castas da colônia de acordo com a função na sociedade  
Fonte: (Zanetti et al, 2009)

A formação de casta está diretamente relacionada a hormônios que controlam o desenvolvimento. Em insetos o hormônio da muda, em especial o hormônio juvenil. Estes hormônios são capazes de reduzir a formação de novos indivíduos. O reprodutor inibe a formação de outros reprodutores liberando feromônios na colônia, este processo também é usado para controlar o número de indivíduos na colônia. Porém, esse processo e sua natureza química ainda são fatores desconhecidos (Constantino et al 2012).

A quantidade de soldados na colônia é controlada por hormônios (feromônios). Quando a colônia apresenta um desequilíbrio, esses hormônios são inibidos permitindo a formação de novos indivíduos até alcançar novamente o equilíbrio (Constantino et al 2012).

Geralmente os operários constituem a casta mais numerosa na colônia e são estéreis. Suas funções consistem em construir o ninho, coletar e alimentar todos os outros indivíduos (Zanetti et al, 2009). Podem sofrer mudas e transforma-se em soldados, mas nunca em imagos. A proteção da colônia também pode ser uma de suas atribuições. Já os soldados possuem a morfologia da cabeça totalmente voltada à defesa conforme figura 08, para isso a cabeça é modificada e esclerosada. Constantino et al (2012) cita que soldados nunca sofrem mudas, são quase sempre estéreis e são incapazes de alimentar-se por conta própria.

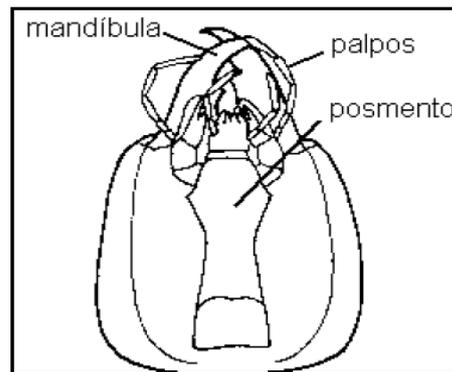


Figura 8: Vista ventral da cabeça de um soldado mandibulado.  
Fonte: (Zanetti et al, 2009).

Na mesma colônia pode haver reprodutores primários e secundários, os primários são os que fundaram a colônia, e os secundários podem assumir a posição de reprodutor mediante a morte de um reprodutor primário (Zanetti, 2009). Segundo Constantino et al (2012) os reprodutores secundários são classificados em três tipos, de acordo com sua origem: ninfoides, ergatoides e adultoides.

### 3.2.2. Diagnose

São insetos hemimetábolos, terrestres, variando de 3 a 25 mm de comprimento, excluindo as asas. São sociais e polimórficos, vivendo em colônias de tamanho variável, com formas ápteras estéreis (operários e soldados) e reprodutores alados (imagos). Olho composto presentes nos adultos, vestigial ou ausente nos operários e soldados, Aparelho bucal mastigador. Antena moniliforme ou filiforme, com 10 a 32 artículos (ate 21 nas espécies brasileiras). Tarsos com três a cinco tarsômeros, quatro em todas as espécies brasileiras. Asa anterior e posterior semelhantes, exceto em *Mastotermes darwiniensis* Froggatt, da Austrália, que ainda mantem o lobo anal da asa posterior desenvolvida. Asas com linha basal, onde se quebram após a revoada. Cerco geralmente curto, com dois artículos em todas as espécies brasileiras; longo, com ate oito artículos em Termopsidae. Genitália externa ausente ou reduzida, exceto em *Stolotermes inopinus* Gay, da Nova Zelândia (Constantino et al, 2012).

Segundo Zanetti et al (2009) o desenvolvimento deste inseto é por Paurometabolia (ovo-ninfa-adulto) e o ciclo de vida está representado na figura 09.

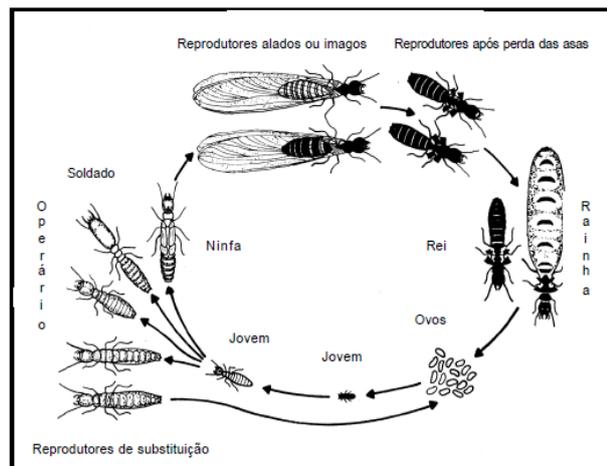


Figura 9: Ciclo de vida de cupins  
Fonte: (Zanetti et al, 2009)

### 3.2.3. Morfologia

A morfologia dos isópteros varia de acordo com a espécie e com a casta. A presença ou ausência do hormônio juvenil é determinante para a manutenção da forma jovem ou alcance da fase adulta (Constantino et al, 2012).

As formas jovens que estão em primeiro estágio são similares, já no segundo estágio a morfologia das larvas se diferencia. Uma possuem a cabeça grande, outras não, e essa diferença evidencia os que darão origem aos indivíduos estéreis (soldados e operários) dos reprodutores (Zanetti, 2009).

#### 3.2.3.1. Morfologia de Adultos

A morfologia dos adultos constituem indivíduos com cabeça arredondada achatada dorso-ventralmente. Os olhos são compostos e sempre presentes nesta classe, grande, redondo ou oval, também presente um par de ocelos nas proximidades dos olhos; esses ocelos são ausentes em algumas espécies. Possui antenas moniliformes ou filiformes que se localizam nas laterais dos olhos, com o número de artículos variando de 13 a 21 nas espécies brasileiras. As fontanelas possuem formas e tamanhos distintos, e localizam-se na região frontal de algumas espécies como Rhinotermitidae, Serritermitidae e Termitidae. Os clipeos são divididos em anteclipeo membranosos e um pós-clipeo mais rígido e esclerosado. Possuem labro largo, que recobrem as mandíbulas dorsalmente. Possuem mandíbulas capazes de mastigar e triturar, tipo mastigador-triturador, ambos com um dente apical, dentes marginais e uma região molar proximal. Mandíbula esquerda com um a três dentes proximais e um dente molar geralmente localizado sob a proeminência molar (também chamado de dente

subsidiário marginal ou quarto dente marginal). Mandíbula direita com um a dois dentes marginais, algumas espécies portando pequeno dente subsidiário entre o primeiro dente marginal e o apical. Região molar com ranhuras bem desenvolvidas em espécies xilófagas, menos desenvolvidas ou ausentes nas demais. As asas anteriores e posteriores são idênticas do tipo membranosas e com venação fraca. Asas possuem uma linha basal onde se quebram após a revoada. A venação das asas tem pouca importância taxonômica em Isóptera (Constantino et al, 2012).

A morfologia dos soldados diferencia-se dos demais principalmente na cabeça que é adaptada em função dos vários mecanismos de defesa presentes em diferentes espécies. As mandíbulas são muito grandes e de muitas formas diferentes, ou atrofiadas e vestigiais. Em *Rhinotermitidae* e *Termitidae*, há uma glândula frontal responsável pela produção de uma secreção defensiva, armazenada num reservatório no interior da capsula cefálica, que é liberada através de um poro frontal. Em *Nasutitermitinae*, o poro é estreito e está localizado na ponta de um tubo longo, cônico ou cilíndrico. Em *Syntermitinae*, o poro é largo e pode estar localizado na ponta de um tubo de tamanho variável e também possuem glândulas frontais. A glândula frontal é muito ou pouca desenvolvida, dependendo da espécie. Há apenas vestígios de olhos ou total ausência. A espécie *Apicotermitinae* neotropicais não possuem soldados (Constantino et al, 2012). As figuras 10 e 11 destacam a morfologia externa de soldados:

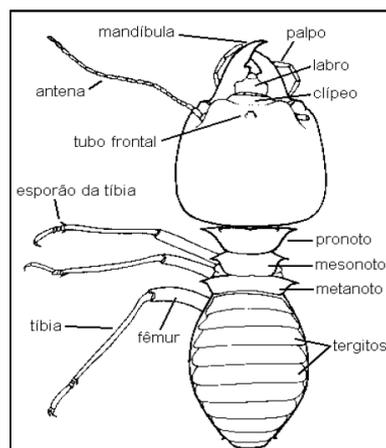


Figura 10: Morfologia de soldados  
Fonte: (Zanetti et al, 2009).

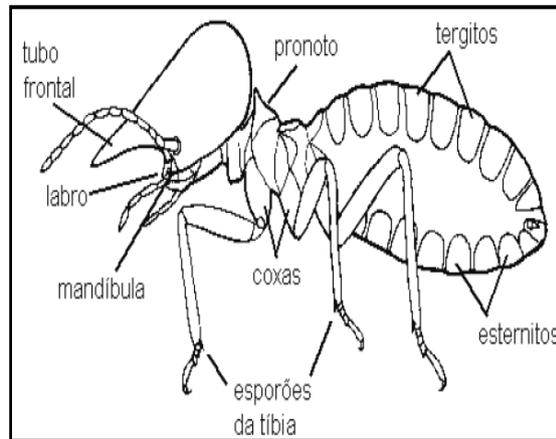


Figura 11: Soldado nasuto de *Syntermes* sp. com suas estruturas corporais externas  
 Fonte: (Zanetti et al, 2009).

Já os operários possuem pouca variação morfológica quando comparados aos soldados. Não possuem olhos, somente vestígios. A morfologia da cabeça é oval ou arredondada e suas mandíbulas podem variar bastante em função da dieta alimentar. Os xilófagos possuem mandíbulas com dente apical curto e placa molar reta com ranhuras salientes. Humívoros possuem mandíbulas com dente apical grande e placa molar côncava sem ranhuras. Entre esses dois extremos, existem várias formas intermediárias e algumas especializadas. Segundo Constantino et al (2012), o tubo digestivo também varia bastante entre diferentes grupos, especialmente o proctodeo. A morfologia do tubo digestivo é importante na taxonomia de Termitidae. A válvula entérica, que separa o primeiro segmento do proctodeo da parte posterior, frequentemente tem uma armadura esclerosada, com placas e espinhos de formas variadas. Essa armadura é usada como caráter taxonômico em muitos grupos.

A figura 12 evidencia as semelhanças e diferenças entre as castas (reprodutores, operário e soldado).

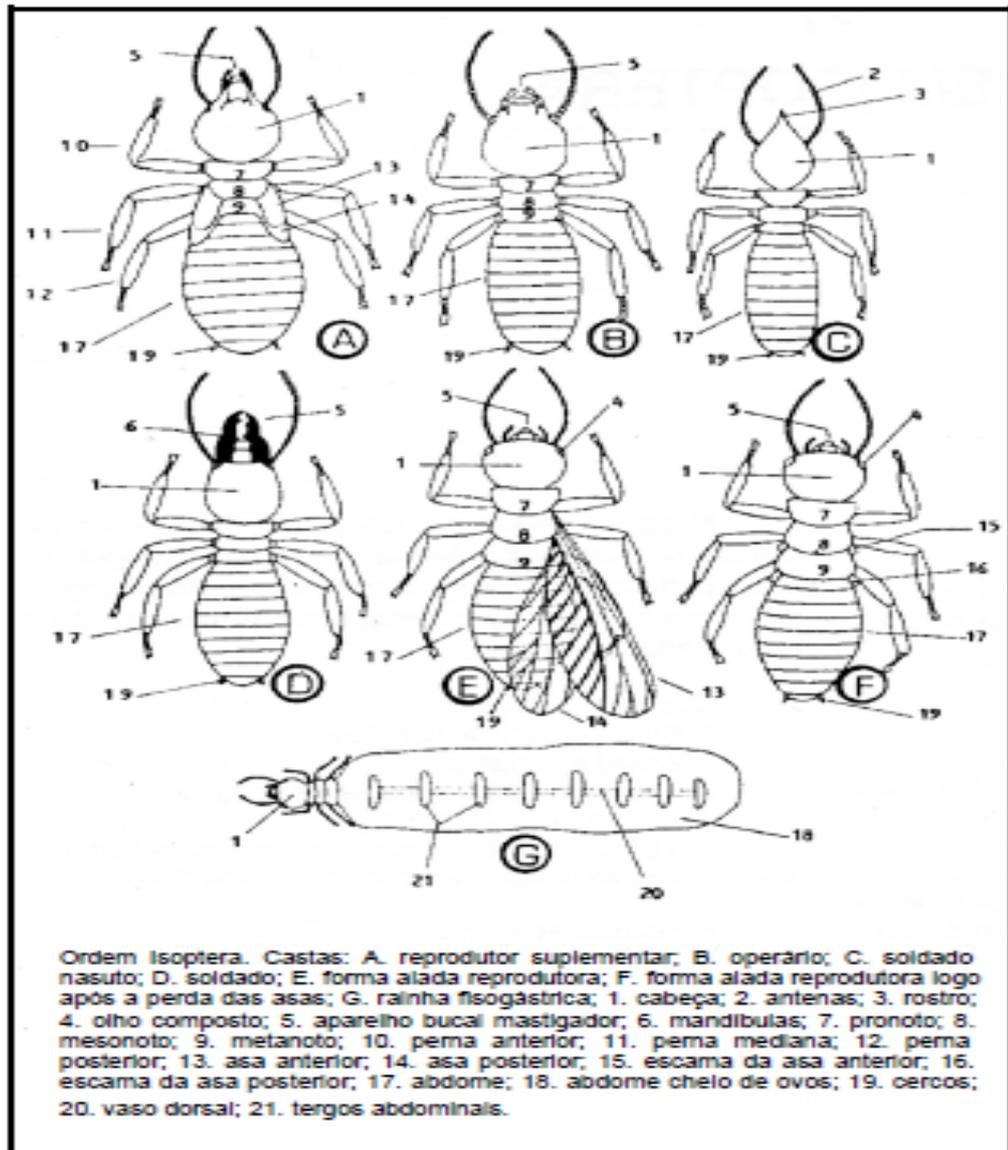


Figura 12: Castas: A. Reprodutor suplementar; B. Operário; C. Soldado nasuto; D. Soldado; E. Forma alada reprodutora; F. Forma alada reprodutora logo após a perda da asa; G. Rainha fisogástrica  
Fonte: (Zanetti et al, 2009).

### 3.2.4. Hábitos Alimentares

Cupins são conhecidos como pragas urbanas devido ao estrago causado pelo consumo principalmente de madeira como componente de sua dieta. No entanto os cupins não se alimentam apenas de madeira, o tipo de alimentação varia conforme a espécie e a casta.

Nesta função destaca-se a atuação dos operários que são os responsáveis por prover a alimentação de toda a colônia, tanto a de sua casta quanto de castas dependentes, desempenhando um papel fundamental para a sobrevivência da colônia. Jovens, soldados e

reprodutores são incapazes de se alimentar sozinhos e recebem dos operários a alimentação do tipo estomodeal ou proctodeal (Lima & Leonardo, 2007).

Os reprodutores funcionais (rei e rainha) se alimentam por alimentação estomodeal onde recebem dos operários somente saliva que é um líquido claro rico em nutrientes ou de alimento regurgitado (Zanetti, 2009). Já os soldados recebem apenas alimentação regurgitada. Cupins inferiores costumam se alimentar de alimentação proctodeal, rico em protozoários flagelados e outros simbioses. Esses simbioses são capazes de excretar enzimas que facilitam e transformam seu alimento rico em celulose em substâncias menos complexa permitindo assim sua assimilação. Segundo Lima & Leonardo (2007), o alimento proctodeal consiste de excreções líquidas ricas em simbioses, provenientes do intestino superior e que são eliminadas em resposta a estímulos táteis de outros cupins.

A alimentação dos cupins possui baixo valor nutricional e é composta principalmente de material celulósico e derivados como plantas vivas ou mortas ou em decomposição. Os diferentes tipos de recursos alimentares segundo Lima & Leonardo (2007) são:

- Madeira;
- Grama, plantas herbáceas e serapilheiras;
- Fungos;
- Produtos animais: Ninho cartonado, Esterco, Carcaças, Húmus;
- Dietas especiais: Canibalismo, necrofagia e oofagia, Líquens.

Constantino et al (2012) classifica os hábitos alimentares dos cupins em:

- Xilófagos: alimentam-se exclusivamente ou principalmente de madeira;
- Geófagos: alimentam-se de matéria orgânica do solo, ingerindo grande quantidade de solo mineral;
- Intermediários: Alimentam-se de matéria vegetal semidecomposta, especialmente madeira podre;
- Comedores de folha de serapilheira ou ceifadores: cortam pedaços de folhas mortas e carregam para o ninho ou comem no local;
- Especializados: especialmente de líquens;
- Cultivadores de fungos: alimentam-se de favos de fungos.

### 3.2.5. Microrganismos associados aos isópteros

As simbioses entre térmitas e microrganismos são conhecidas, ao menos parcialmente, desde 1923, em que R. L. Cleveland, demonstrou em uma série de artigos, a simbiose entre protozoários flagelados e térmitas inferiores (Aquino, Correia, e Menezes 2008). 1969). Através destes trabalhos pioneiros, Cleveland observou que os simbiontes ingeriam partículas de madeira que eram fragmentadas pelo hospedeiro, convertendo à celulose a glicose e posteriormente a glicogênio. Todos os metabólitos eram produzidos em excesso para as necessidades dos protozoários, permitindo que fossem utilizados pelos térmitas (Aquino, Correia, e Menezes 2008).

No caso de térmitas superiores (família Termitidae), (Aquino, Correia, e Menezes 2008), afirma em revisão sobre processos bioquímicos em térmitas, que apesar de se ter demonstrado que havia atividade celulolíticas em espécie desta família, não era possível afirmar se as celulases eram oriundas dos térmitas ou de sua flora intestinal. Nesta época já era um fato bem conhecido à ausência de flagelados em espécies de Termitidae.

Atualmente, com a ajuda de técnicas moleculares foi possível avançar bastante no conhecimento sobre as simbioses entre microrganismos e térmitas. As bactérias são extremamente diversas e abundantes no tubo digestivo dos térmitas, tanto inferiores quanto superiores. Foram observadas inclusive simbioses tripartites, ou seja, com três organismos diferentes, envolvendo térmitas, protozoários flagelados e bactérias aderidas aos protozoários.

- **Protozoários**

A associação entre cupins e protozoários flagelados celulolíticos é um exemplo clássico e bem estudado de simbiose. A maior parte desses flagelados está restrita ao tubo digestivo dos térmitas inferiores e baratas que se alimentam de madeira (Aquino, Correia, e Menezes 2008). Estes protistas pertencem a Classe Parabasalea (incluindo as ordens Trichomonadida e Hypermastigida) e a ordem Oximonadida (Aquino, Correia, e Menezes 2008).

Esta simbiose é de tal forma importante para os térmitas que uma grande porção do volume do intestino posterior (o que equivale a cerca de um terço do peso corpóreo do cupim) é colonizada por flagelados. As partículas de madeira que são fragmentadas pelo térmita são fagocitadas e degradadas pelo protozoário (Brune e Friedrich 2000, apud Aquino, Correia, e

Menezes 2008). As operarias carregam o alimento digerido para o ninho e o regurgitam para alimentar as ninfas, soldados e reprodutivo. Este processo chamado trofolaxis é um mecanismo comportamental que também garante a inoculação dos flagelados (Grassé 1982 apud Aquino, Correia, e Menezes 2008).

- **Bactérias**

Apesar de seu pequeno tamanho, os térmitas abrigam em seu intestino uma diversidade impressionante de microrganismos. Um dos fatores que contribui para isso é o fato de que o tubo digestivo desses insetos é altamente compartimentalizado conforme figura 13, com um forte gradiente de condições físicas químicas, tais como pH e oxigênio dissolvido (Yang et al 2005). Mesmo nos térmitas que se alimentam de madeira e que não possuem uma compartimentação tão evidente, ainda assim a diversidade associada é considerável. (Aquino, Correia, e Menezes 2008).

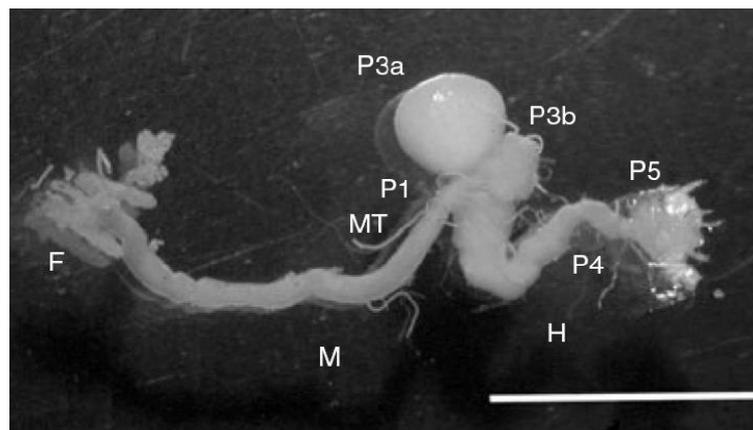


Figura 13: Tubo digestivo isolado do térmita australiano *Mastotermes darwinenses*. Barra 5 mm, F intestino anterior com glândulas salivares, esôfago, moela e papo; M intestino médio; MT Tubulos de Malpighi; H intestino posterior; P1 seguimento proctodeal seguido pela válvula entérica; P3 pança; P4 cólon; P5 reto (modificado de König 2006).

Warnecke et al. (2007) realizaram uma análise metagenômica da comunidade bacteriana residente na porção do intestino posterior conhecida como pança do térmita xilófago *Nasutitermes* sp., que revelou a ocorrência de representantes de 12 filos e 216 filotipos de bactérias. Dentre estes, os 24 filotipos mais frequentemente recuperados pertenciam ao gênero *Treponema* ou ao Filo Fibrobacteres. Além disso, neste mesmo estudo, 12 gens homólogos *nifH* foram identificados, evidenciando a presença de bactérias fixadoras de N associadas a este inseto.

Em outro estudo sobre a diversidade da comunidade bacteriana em quatro espécies de térmitas superiores pertencentes a vários grupos funcionais, foi observada a dominância de Firmiculis (Clostridia e Bacilli), embora a composição filogenética tenha variado entre as espécies de térmitas, (Aquino, Correia, e Menezes 2008).

- **Simbiose Tripartites**

Uma das descobertas mais importantes e surpreendentes em estudos sobre a ecologia microbiana do tubo digestivo dos térmitas é a simbiose entre protozoários flagelados do intestino de térmitas e bactérias. É uma simbiose tripartite que envolve o térmita, o protozoário e a bactéria simbiote intracelular do protista (Noda et al.,2007). Essas bactérias descritas pela primeira vez em um trabalho de Ohkuma & Kudo (1996) representam um grupo designado "Termite Group I", muito abundante no tubo digestivo de térmitas, que não tem representantes culturáveis e que tem sido propostos como um candidato a um novo filo de bactérias (Ohkuma, et al 2007).

Além disso, alguns estudos tem relatado também a presença de ectosimbiontes destes protistas, principalmente espiroquetas do gênero *Treponema*. Em termos funcionais algumas dessas bactérias são capazes de realizar acetogênese a partir de CO<sub>2</sub>, o que tem um efeito benéfico para o térmita, no caso específico de *Zootermopsis angusticollis*, o acetato é a sua principal fonte de carbono e energia (Aquino, Correia, e Menezes 2008).

- **Fungos**

A primeira menção a ninhos de cupins em que foram observados cultivos de fungos, em inglês "fungus combs" ou "fungus gardens" foi feita por J. G. Koning em 1779, nos arredores da vila de Tanschaur, na Índia (Grassé, 1982).

Atualmente são conhecidas 330 espécies de térmitas que cultivam fungos simbioticamente em seus ninhos, distribuídas em 12 gêneros da subfamília Macrotermitinae, família Termitidae (Aanem et al., 2007).

Até o momento todas as espécies conhecidas são originárias da África ou da Ásia, não possuindo nenhum representante das Américas. As operárias alimentam-se de material celulósico, portanto rico em carbono, usam as fezes para construir as estruturas dos ninhos, que por sua vez, é colonizada por fungos basidiomicetos do gênero *Termitomyces*. Após algumas semanas, o fungo começa a produzir estruturas vegetativas, chamadas nódulos, que são consumidos pelos cupins. A biomassa do fungo é um material muito mais rico em nitrogênio do que a matéria vegetal. Desta forma, este tipo de simbiose é uma das soluções encontradas pelos térmitas para garantir um aporte de nitrogênio satisfatório.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Coleta dos Isópteros

A seis coletas de cupinzeiros ocorreram de forma aleatória. Os isópteros (cupins) foram retirados de árvores e de solo localizados na estrada Coari Itapéua e no Centro de Apoio à Pesquisa do Médio Solimões localizada na referida estrada, situada no município de Coari, Estado do Amazonas, com coordenadas geográficas conforme a tabela 02:

Tabela 2: Denominação preliminar, habitats e coordenadas geográficas das coletas de isópteros

Coleta	Denominação Preliminar	Habitat dos térmitas	Coordenadas geográficas	Elevação	Azimute
1	UPC 1	Árvore	S04°06.880' / W 063°07.751'	37 m	250
2	UPC 2	Árvore	S04°06.948' / W 063°06.485'	40 m	250
3	UPC 3	Solo	S04°07.134' / W 063°04.457'	41 m	250
4	UPC 4	Árvore	S04°07.158' / W 063°04.452'	34 m	250
5	UPC 5	Solo	S04°07.242' / W 063°04.401'	42 m	250
6	UPC 6	Solo	S04°07.277' / W 063°04.407'	51 m	250

Os ninhos de cupins (cupinzeiros) foram armazenados em sacos plásticos, identificados e transportados ao laboratório de Microbiologia do Instituto de Saúde e Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas em Coari.

### 4.2. Tratamentos iniciais e Introdução do macerado de cupins em meio Mineral Mínimo BH

Os microrganismos associados aos cupins foram obtidos através dos processos de separação dos ninhos e solo, pesagem de aproximadamente 3 gramas de cupins e maceração em 10 mL de BH (Bushnell Hass Broth, 37g/L, ph 7) conforme as figuras 13, 14, 15 e 16.



Figura 14: Separação de cupins do ninho



Figura 15: Pesagem de cupins



Figura 16: Maceração de cupins em 10 mL de BH



Figura 17: Maceração de cupins

Os cupins foram macerados em 10 mL de BH (meio mínimo) em almofariz e pistilo, em seguida a mistura de cupim foi depositado em um erlemeyer de 250 mL contendo o meio

nutritivo constituído 87 mL de meio de BH, 3 % de petróleo (3 mL) e 10 mL da solução macerada de cupins, conforme a tabela 3.

O petróleo foi utilizado como fonte de carbono, conforme Cerqueira (2007) que relata que a fonte de carbono é um dos fatores mais importantes para a produção de todo e qualquer biossurfactante, a composição do meio de cultivo vai influenciar diretamente a quantidade e as propriedades dos biossurfactantes a serem produzidos. As fontes de carbono que normalmente são usadas podem ser divididas em três categorias: carboidratos, hidrocarbonetos e óleos vegetais, Vaz (2013).

O controle abiótico utilizado nesta etapa serviu para comparações como: espessura da camada de óleo; turvação; e possível produção de biossurfactantes. No controle foram usados 97 mL de BH e 3 mL de petróleo.

Tabela 3: Denominação preliminar, habitat, composição do meio.

Identificação preliminar	Origem das espécies de cupins	Composição nos Erlemeyer
UPC 1	Árvore	10 mL de solução de microrganismos, 87 mL de BH, 3 mL de petróleo
UPC 2	Árvore	10 mL de solução de microrganismos, 87 mL de BH, 3 mL de petróleo
UPC 3	Solo	10 mL de solução de microrganismos, 87 mL de BH, 3 mL de petróleo
UPC 4	Árvore	10 mL de solução de microrganismos, 87 mL de BH, 3 mL de petróleo
UPC 5	Solo	10 mL de solução de microrganismos, 87 mL de BH, 3 mL de petróleo
UPC 6	Solo	10 mL de solução de microrganismos, 87 mL de BH, 3 mL de petróleo
Controle		97 mL de BH, 3 mL de petróleo.



Figura 18: Inóculos contendo meio mínimo BH e macerado de cupins

Os erlemeyers contendo as soluções de microrganismos foram depositados em plataforma de agitação (Shaker S L 222, marca Solab) com rotação de 150 rpm a 30° C, evitando que a camada de óleo impeça a entrada de oxigênio para organismos aeróbios. De acordo com Tonini, Rezende e Gravitol (2010) em bactérias aeróbias, o oxigênio não é apenas acceptor terminal de elétrons para a conservação de energia respiratória, mas também um reagente indispensável no mecanismo de ativação.

#### **4.3. Produção de Biossurfactantes em consórcio**

Os biossurfactantes apresentam características macroscópicas que se assimilam a presença de sabão nas paredes dos recipientes. Esta condição é uma das propriedades dos biossurfactantes que consiste na formação de um filme molecular organizado nas interfaces, reduzindo as tensões (Nitschke & Pastore, 2002).

Os recipientes denominados UPC1, UPC 2, UPC 3, UPC 4, UPC 5 e UPC 6, contendo as composições descritas na tabela 03, contidos no shaker foram observados diariamente e características como turvação e possível produção de biossurfactantes eram constantemente anotados.

#### **4.4. Seleção da coleta com microrganismos com potencial produtor de Biossurfactantes**

As seis coletas iniciais foram mantidas em condições de cultivo semelhante. Após observações diárias, em especial a partir do quinto dia de cultivo, foram selecionados os meios que apresentavam a produção de biossurfactantes através da formação de micelas que se assemelhavam a presença de sabão nas paredes das vidrarias onde os meios estavam sendo mantidos.

#### 4.5. Identificação e classificação das espécies de cupins

Após a seleção da coleta de cupins que resultaram em produção de biossurfactantes, foi realizada a identificação dos cupins das referidas coletas. Indivíduos destas coletas permaneciam conservados em eppendorf em álcool 70 %.



Figura 19: Cupins conservados para a identificação da espécie.

A identificação ocorreu no laboratório de Zoologia da Universidade Federal do Amazonas, onde a morfologia dos cupins preservados foi observada pela entomóloga Doutora Ana Claudia Kaminski. Os indivíduos foram visualizados em lupa e suas famílias foram relacionadas à visualização morfológica da fontanela, pronoto, e por chaves dicotômicas conforme Constantino (2012).



Figura 20: Morfologia externa de isópteros

#### 4.6. Técnicas utilizadas para a obtenção de linhagens bacterianas

##### 4.6.1. Técnica de Diluição Seriada e Esgotamento em Estrias nos meios PCA

Os meios de cultura identificados selecionados passaram pela técnica de diluição seriada, plaqueamento em triplicatas, e incubação visando a contagem de UFC (unidades formadoras de colônias) para visualização de distintos morfotipos presentes em cada meio de

cultura (figura 20), visando uma posterior seleção. Nesta técnica utilizou-se: Solução Salina na concentração de 0,85%; placas com meio Ágar padrão para contagem (PCA), utilizadas no plaqueamento e nas técnicas de esgotamento por estrias; alça de platina; 1 mL da solução contendo os microrganismos; vidrarias, fluxo laminar e estufa bacteriológica para incubação. Após esta etapa as placas contendo os microrganismos foram encubadas em estufa bacteriológica a 30° C e observadas a partir de 24 horas.

Segundo Pelczar, Chan & Krieg (1997) durante a incubação do meio inoculado, as células individuais começam a se multiplicar e produzem um grande número de microrganismos unidos formando colônias. As unidades formadoras de colônias (UFC) estão expostas na figura 20.

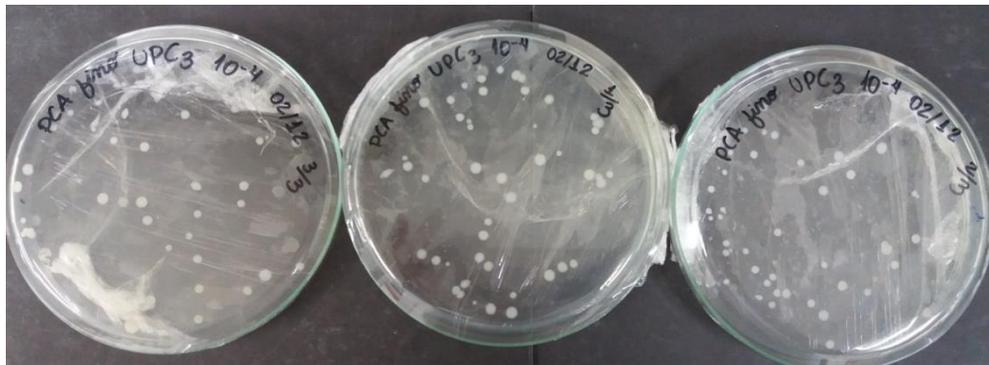


Figura 21: Plaqueamento em PCA após incubação de 48h da triplicata  $10^{-4}$ .

As distintas colônias obtidas pelo processo de plaqueamento passaram por técnicas para obtenção de culturas puras a fim de determinar as características macroscópicas e microscópicas de cada linhagem. A técnica utilizada para o isolamento dos microrganismos e obtenção de cultura pura foi o método de esgotamento por meio de estrias (figura 21-22).

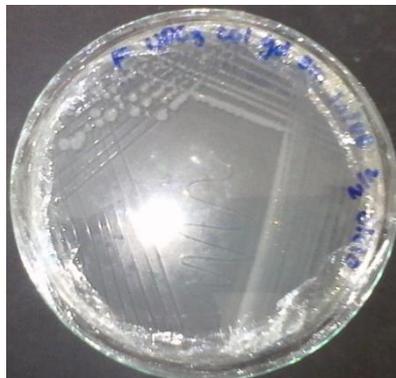


Figura 22: Esgotamento por meio de estrias



Figura 23: Estrias em meio PCA

O esgotamento por meio de estrias é a técnica que se executa com o auxílio da alça de platina, onde, retira-se uma alçada de microrganismos da colônia anteriormente isolada e repica-se em 6 a 7 linhas, flambando em chama a cada giro da placa conforme a figura 21 e 22.

#### **4.7. Caracterizações macroscópica, microscópica e presença de cápsula do consórcio selecionado.**

As coletas de cupins selecionadas resultaram no isolamento de linhagens puras de microrganismos. Suas nomeações preliminares, origens, características macroscópicas e microscópicas estão descritos no item 4.2 e resumidos na tabela 3.

Os itens observados para a caracterização macroscópicas dos morfotipos consistiram em: tamanhos das colônias, coloração, bordas, relevo, umidade, odor, escassez e abundância. Já os itens utilizados para a caracterização microscópica consistiu na técnica de coloração de Gram que classifica as bactérias em dois grupos: Gram positivas e Gram negativas.

O objetivo na coloração de Gram consiste na identificação microscópica de detalhes como forma e arranjos característicos das células. Neste processo utilizaram-se esfregaços bacterianos que foram lavados por corantes em sequência. O primeiro é o corante púrpura *crystal violeta*, em seguida o esfregaço é banhado pela *solução de iodo* (substância que fixa o corante no interior da célula), posteriormente usa-se o álcool (como removedor do corante em algumas bactérias), e por último o corante vermelho, chamado *safranina* (Pelczar, Chan & Krieg 1997).

Neste processo retirou-se da placa purificada uma alçada de microrganismo e fez-se o esfregaço sobre uma lâmina de vidro contendo uma gota de água destilada, em seguida

flambou-se a parte inferior da lâmina fixando a amostra. Posteriormente seguiu-se o protocolo denominado Conjunto para coloração de Gram do fabricante Laborclin (Produtos para laboratórios Ltda).

Depois de coradas os morfotipos foram visualizados no microscópio. Os microrganismos que retém o corante cristal violeta e aparecem coradas em violeta escuro (púrpura escura) são classificadas como bactérias Gram-positivas. As coradas em tons avermelhados foram classificadas em Gram-negativa, (Pelczar, Chan & Krieg 1997). As visualizações estão detalhadas nas figuras 23 e 24.



Figura 24: Coloração de Gram

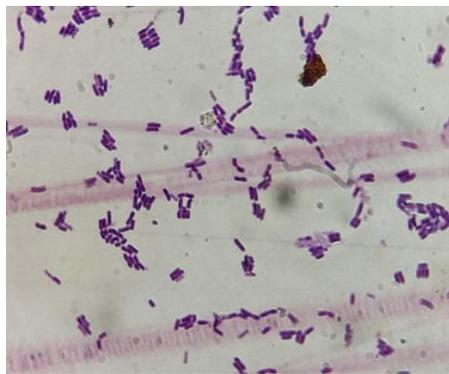


Figura 25: Detalhes dos arranjos celulares

Para a realização do teste para detecção da presença de cápsula bacteriana, preparou-se lâminas contendo uma alçada do microrganismo proveniente de cultura pura, sobre esta lâmina adiciona-se 2  $\mu$ L de tinta nanquim, seguindo para a coloração pelo método de coloração de Gram, conforme figura 25 e 26.



Figura 26: Teste de Cápsula

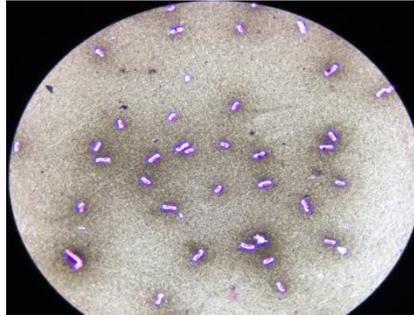


Figura 27: Lâmina corada para a detecção de Cápsula

#### 4.8. Preservação de Microrganismos em Glicerol

Todas as linhagens provenientes das coletas selecionadas foram conservadas em glicerol. Para esta preservação utilizou-se 13,0 g/L de caldo nutriente (Nutrient Broth). Para o preparo de 200 mL de glicerol utilizou-se 2,6 g de caldo nutriente dissolvidos em 170 mL de água destilada e 30 mL de Glicerol.

Foram adicionados 1,8 mL do preparo de glicerol em eppendorf de 2 mL, em seguida com a alça de platina retira-se uma alçada da placa onde os microrganismos encontram-se puros, macerando até que eles estejam no soltos no glicerol, seguindo para o congelamento (figura 27).



Figura 28: Criotubos contendo microrganismos conservados em Glicerol

Em todos os morfotipos encontrados a conservação em glicerol ocorreu em triplicatas para garantir sua manutenção.

#### 4.9. Teste individual de produção de Biossurfactantes

O teste de produção Individual de Biossurfactante consistiu no inóculo constituído por meio BH (Bushnell Hass Broth) (97 mL), 3 % de petróleo (3 mL), 100 µL de LB (Luria Bertani), e cinco alças do microrganismo provindo de cultura pura anteriormente obtida através de esgotamento por meio de estrias. Após a inoculação a cultura foi mantida em incubadora shaker a 150 rpm visando a produção de biossurfactante com observação a cada 24 h. A figura 28 mostra as culturas em fase inicial de cultivo.

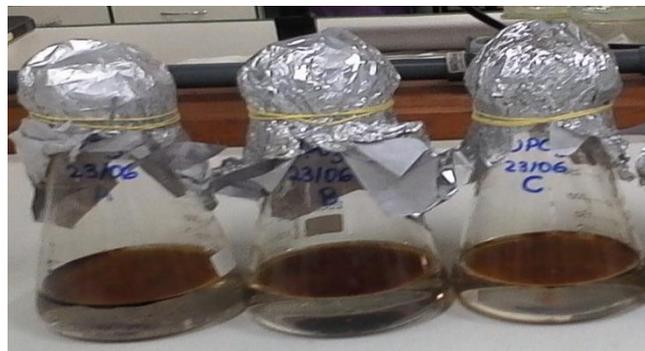


Figura 29: Inóculos contendo microrganismos isolados

Durante esta observação selecionou-se a linhagem com maior evidência na produção de biossurfactante, e após esta seleção os demais morfotipos que não apresentaram bons resultados foram eliminados nesta etapa da pesquisa. O morfotipos selecionado seguiu para as etapas posteriores como: identificação molecular e testes de produção de biossurfactante através da redução da tensão superficial.

#### 4.10. Identificação Molecular

A identificação molecular dos microrganismos coletados foi possível através da técnica como PCR (reação em Cadeia Polimerase) e sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16 S.

Segundo Doublet et al (2008) a PCR por ser uma técnica altamente específica, a PCR pode ser realizada utilizando o DNA cromossomal ou mesmo o DNA plasmidial, sendo assim possível traçar o perfil genético de um organismo a partir de genes conhecidos e únicos para a espécie

O sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16S possui importante relevância na identificação de microrganismos, ele é usado como indicadores taxonômicos e filogenéticos (BECKER et al. 2004) e é considerado o método de referência para a identificação bacteriana (LANGE et al, 2011).

#### **4.10.1. Preparo do Lisado Celular**

Para este estudo primeiramente foi realizada a extração do DNA de uma cultura previamente preparada conforme método de Extração por Fenol/Clorofórmio (Sambrook e Russel 2001). Para esta extração foram primeiramente aquecidos banho maria nas temperaturas de 37° a 55° C; e preparado tampão de digestão de lisozima, para 200 mL do tampão de digestão/amostra, neste foi adicionado lisozima para uma concentração final de 20 mg/mL.

Em seguida foi centrifugada a cultura celular em centrífuga a 12.000g por 2 minutos, seguindo pela ressuspensão do palet em 180 µL do tampão de digestão da lisozima, para a mistura completa utilizou-se o vortex, em seguida a mistura foi incubada a 37° C por 30 minutos.

Adiciona-se 20 µL de proteinase K seguindo para a mistura no vortex, após a mistura adicionou-se 200 µL de tampão de lise Purelink Genomic (kit de extração e misture bem utilizando o vortex, seguindo para incubação a 55 ° C por 30 minutos. O próximo passo foi a adição de 200 µL de etanol (96 % - 100%) ao lisado, misturando bem por 5 segundos no vortex, obtendo assim uma solução homogênea.

#### **4.10.2. Ligação do Dna**

Para a ligação do Dna foi posicionada uma coluna (Purelink Spin) no tubo de coleta, em seguida carregou-se o lisado (640 µL) com o tampão de lise e etanol e adicione 200 µL de etanol (96 % - 100%) ao lisado, misturando bem por 5 segundos no vortex.

Posteriormente a coluna preparada é centrifugada a 10.000xg por um minuto a temperatura ambiente, em seguida descarta-se o tubo de coleta e posicionou-se a coluna em um novo tubo de coleta.

#### 4.10.3. Lavagem do DNA

Lava-se a coluna com 500  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem 01, em seguida realiza-se a centrifugação da coluna a 10.000xg por 1 minuto a temperatura ambiente. Em seguida descarta-se o tubo de coleta e posiciona-se um novo tubo de coleta. Lava-se a coluna com 500  $\mu\text{L}$  do tampão de lavagem 2, centrifugando-a e seguida na velocidade máxima por três minutos a temperatura ambiente descartando o tubo de coleta em seguida.

#### 4.10.4. Eluição do Dna

Para a eluição do dna primeiramente posiciona-se a coluna em um tubo novo de 1,5 mL, em seguida eluir o Dna com 25 a 200  $\mu\text{L}$  de tampão de eluição PureLink, encubando a coluna em temperatura ambiente por um minuto, seguindo para a centrifugação na velocidade máxima por um minuto também em temperatura ambiente. Em seguida foi realizado a análise de Dna por eletroforese em gel de agarose, podendo também ser quantificado por espectrofotometria.

#### 4.10.5. Análise de Dna por eletroforese em gel de Agarose

Nesta esta etapa adicionou-se 0,4 gramas de agarose para o preparo de 50 mL em erlemeyer de 250 mL. Em seguida levou-se a agarose para fundir em forno micro-ondas em alta temperatura ate que a solução se tornou homogênea ou transparente. A terceira etapa ocorreu quando a temperatura da agarose baixou em torno de 50°C. Quando foi alcançada esta temperatura adicionou-se brometo de etídeo em um volume apropriado, obtendo a concentração final entre 0,1-0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Após esta etapa verteu-se o volume do erlemeyer no molde de gel, eliminando as bolhas que surgiram durante o processo, colocando também o pente para a formação dos poços conforme a figura 29.

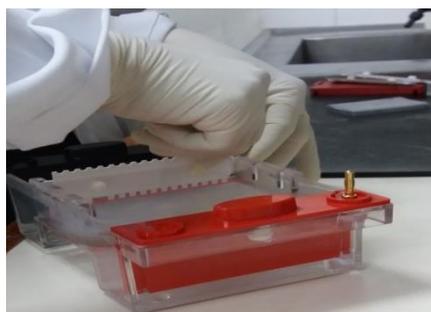


Figura 30: Pentes para a formação dos poços

Após este processo deixou-se gelificar a temperatura ambiente por 30 a 40 minutos.

#### 4.10.6. Procedimentos para a Eletroforese

Após a etapa de preparo do gel de agarose, transferiu-se o mesmo para uma cuba de corrida, vertendo também tampão em quantidade necessária para que o gel ficasse totalmente submerso. Posteriormente aplicaram-se as amostras de DNA já contendo o tampão de amostra com o auxílio de uma pipeta automática conforme figura 30. Posteriormente tampou-se a cuba conectando-a aos cabos a fonte de tensão de maneira que a migração ocorra do polo negativo para o polo positivo. Vale frisar que foi de extrema importância a verificação da voltagem conforme a especificação da cuba, e que o acompanhamento da corrida foi feito usando como referência a coloração azul de bromofenol.



Figura 31: Aplicação das amostras de Dna na Cuba

A migração das bandas ocorreu em um intervalo entre 30 a 40 minutos, finalizando esta etapa no desligamento da fonte de tensão, remoção do gel da cuba, e análise do padrão de migração expondo o gel à luz UV.

#### 4.10.7. Reação em cadeia Polimerase (PCR) e amplificação genica utilizando Primer 16 S

A primeira etapa consistiu na realização da PCR, que foi realizada a fim de possibilitar a amplificação dos fragmentos gênicos anteriormente tratados.

COX, DOUDNA, O'DONNELL (2012), abordam que quando sabemos pelo menos a sequência das porções terminais do segmento de DNA no qual estamos interessados, podemos amplificar enormemente o número de cópias de tal segmento com a reação em cadeia da polimerase (PCR), um processo concebido por Kary Mullis em 1983.

Neste procedimento utilizou-se o iniciador abaixo:

Tabela 4: Iniciador utilizado na PCR

Iniciador	Sequência
16 S Reverse	R (5'- TGA CTG ACT GAG AGC TCT ACC TTG TTA CGM YTT - 3')

A segunda etapa condiz no preparo da mistura de reação de acordo com a tabela 05.

Tabela 5: Reagentes utilizados

Reagentes do Sistema	Tubo 1 (Tubo teste)	Tubo 2 (Controle negativo)	Preparo da <i>mix</i> para três tubos
Água	14,2 µL *	14,2 *	45,6 µL
Tampão 10 X	2,5 µL	2,5 µL	7,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 Mm)	2,5 µL	2,5 µL	7,5 µL
dNTPs (2,5 mm)	2,5 µL	2,5 µL	
Primer(F) (5pmoles/µg)	1,0 µL	1,0 µL	3,0 µL
Primer(R) (5pmoles/µg)	1,0 µL	1,0 µL	3,0 µL
Taq (5U/µL)	0,3 µL	0,3 µL	0,9 µL
DNA	1,0 µL **	--	xxx
Volume Total	25,0 µL		75,0 µL

Em que \* indicava a utilização do volume necessário para completar o volume final desejado de 25 µL, \*\* indicava a utilização do volume necessário para aproximadamente 10 ng de Dna molde, - - não adicionar Dna, utilizando água (1,0 µL) e xxx não adicionar nenhum reagente.

Obedecidos estes critérios, prosseguiu-se o experimento transferindo 24 µL da mistura de reação preparada *mix* para os tubos identificados como 1 e 2. No tubo 1 foi adicionado 1µL de Dna e ao tubo 2 a adição foi de 1 mL de água conforme especificado na tabela 05.

Em seguida programou-se o termociclador com as condições de ciclagem de amplificação da PCR descritos na tabela 06. Posteriormente colocaram-se os tubos no termociclador deixando que a reação de amplificação seja concluída.

Tabela 6: Etapas, evento, temperatura e tempo

Passo	Temperatura ( °C )	Evento	Tempo
1	95 °	Desnaturação Inicial	2 minutos
2	94 °	Desnaturação	40 segundos
3	X °	Anelamento dos iniciadores ao DNA molde	1 minuto
4	72 °	Elongação pela DNA Polimerase	2 minutos
5	72 °	Elongação Final pela DNA Polimerase	5 minutos
6	4 °	Término de reação	Tempo Indeterminado

As passos 2,3,4 e 5 ocorrem em 35 ciclos, seguindo para a análise do produto de reação por eletroforese em gel de agarose como descrito no item 4.10.5. Em seguida foram utilizados 1/10 a 1/5 do volume de reação para análise em eletroforese.

#### 4.11. Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos

O teste de sensibilidade a antibióticos foi realizado segundo as Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana (Anonymous, NCCLS, 2005). Inicialmente foi preparada uma cultura nova, cultivada em meio LB mantida em shaker a 30 ° a 150 rpm por 24h, desta cultura foram retirados os microrganismos e plaqueadas em meio Mueller-Hinton sólido por meio de esgotamento em estrias. Após o crescimento de 24 h, alçadas de microrganismos foram retiradas e ressuspensas em solução salina 0,85% estéril em eppendorf.

A próxima etapa consistiu na medição da densidade celular em espectrofotômetro a 600 nanômetros e ajustou-se o volume da suspensão para 0,1 de absorbância (equivalente a 0,5 McFarland). Mergulhou-se hastes com algodão estéril nesta suspensão de células por alguns instantes pressionando a haste nas paredes para eliminação de excesso de líquido. Em seguida, inoculou-se em placas (140 mm de diâmetro) contendo o meio Mueller-Hinton sólido (70 mL) por três vezes girando a placa 60° a cada esfregaço.

As placas foram deixadas em repouso por três minutos a fim de absorver o excesso de umidade. Em seguida com o auxílio de uma pinça foi colocada uma unidade de multidiscos de antibióticos (Laborclin) sobre a placa, pressionando-a suavemente para assegurar o contato completo. A placa foi incubada a 30° C por 24 h. Os halos foram medidos utilizando uma régua e considerou-se o halo de inibição a área sem crescimento detectável a olho nu.

Os diâmetros dos halos, detalhados na figura 31, foram interpretados como: resistentes, resistentes intermediários e sensíveis no item 5.5.

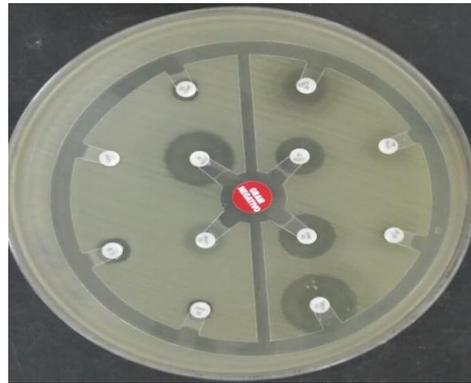


Figura 32: Halos de inibição em placa contendo os antimicrobianos

#### 4.12. Perfil de Crescimento Microbiano

A curva de crescimento microbiano foi realizada no objetivo de detectar os períodos referentes às fases lag (aclimatação do microrganismo), log (crescimento exponencial), estacionária e de declínio do microrganismo isolado, uma vez que em sua fase exponencial ocorre a maior produção do biossurfactante.

Esta etapa ocorreu primeiramente com o preparo do pré-inóculo. Neste utilizaram-se 6 mL do meio nutritivo LB e 100 µL do caldo contendo os microrganismos, inoculados em tubos de ensaio de 10 mL com tampa rosqueável. Os tubos foram adaptados em uma inclinação de aproximadamente 30 ° sob agitação na incubadora shaker a 150 rpm, a 30 ° por 24 horas.

Após este tempo, a cultura contida no tubo de ensaio foi transferida para eppendorf de 2 mL que foram centrifugados a 12.000 rpm por 4 minutos, descartando ao término o sobrenadante. Em seguida os palets contidos nos eppendorf foram ressuspensos em 1 mL de BH, transferindo-se 200 µL destes para novos eppendorf contendo 1,8 mL de BH estéril,

totalizando assim 2 mL da cultura. Em seguida retirou-se 1 mL dos últimos eppendorf para a leitura da densidade celular a 600 nanômetro em espectrofotômetro de luz visível.

Os resultados obtidos da densidade celular foram multiplicados por 10, em seguida dividiu-se o denominador 1000 pelo resultado da densidade multiplicada, este procedimento garantiu que a cultura possua uma concentração inicial de 0,01 de densidade celular. O valor obtido desta divisão, foi pipetado dos eppendorf e inoculados em cinco erlemeyer de 250 mL contendo Bh estéril e uma concentração de 3% de fonte de carbono (petróleo) cada. Os erlemeyer foram incubados em incubadora shaker a 30 ° a 150 rpm e sua densidade celular foi medida a cada 24 horas em espectrofotômetro por 70 dias.

#### **4.13. Teste de Atividade Emulsificante**

Nesta etapa preparou-se o pré-inóculo e o inóculo nas mesmas condições do perfil de crescimento microbiano em três experimentos independentes. As culturas contidas em erlemeyer ao alcançarem sua fase exponencial revelada pelo perfil de crescimento microbiano, foram transferidas para tubos falcon de 50 mL, seguido para centrifugação refrigerada a 4000 rpm a 4° por 30 minutos afim de se recuperar os sobrenadantes. A retirada do petróleo restante ocorreu com o uso de papel toalha estéril por imersão na camada superior do sobrenadante. Tubos de ensaio de 10 mL com tampa rosqueável foram utilizados, nestes foram depositados 4 mL de sobrenadante e sobre eles foram adicionados 4 mL dos solventes orgânicos, Xileno e Hexano. A mistura foi vortexada vigorosamente por 5 minutos e deixou-se descansar. As medidas da altura da fase oleosa, aquosa e emulsificada foram medidas em 24 h para a obtenção dos índices de emulsificação.

O índice de emulsificação foi calculado usando a fórmula  $E \% = He / Ht \times 100$ , onde He é a altura da emulsão e Ht é a altura total. O experimento foi realizado em três experimentos independentes e como controle da atividade emulsificante foram meio de cultura Bh estéril, Triton X- 100 e Tween 20, a 0,5 % (Ismael e Dadasnia, 2015; Camacho-chab et al., 2013; Ortega-Morale et al, 2007; Bouchotroch et al., 2000). Seus dados são discutidos no item 5.8.

#### **4.14. Teste de Hidrofobicidade Celular.**

Para a realização do teste de Hidrofobicidade celular, a cultura bacteriana foi preparada nas mesmas condições do perfil de crescimento microbiano. Esta etapa foi realizada quando a cultura microbiana atingiu sua fase exponencial.

Nesta etapa a cultura foi transferida para falcons de 50 mL e seguiram para a centrifugação refrigerada a 4000 rpm a 4° por 30 minutos. Após este processo o sobrenadante foi descartado. As células recuperadas foram ressuspensas em meio BH estéril em uma densidade celular final de 0,50 a 600 nanômetros de comprimento de onda no aparelho espectrofotômetro. Deste volume, foram adicionados 1,2 mL em um tubo de vidro de 10 mL. Em seguida foram adicionados 500 µL dos substratos hidrofóbicos e petróleo sobre a suspensão que em seguida foi vortexada por 2 minutos. Os tubos foram então deixados para descansar por 1 hora para a completa separação das fases. Após o tempo, toda a fase aquosa foi recuperada com o auxílio de uma pipeta Pasteur e colocada em tubos eppendorf. A absorvância da fase aquosa foi medida a 600 nm de comprimento de onda usando uma cubeta de acrílico, tendo como o branco o BH estéril. A Hidrofobicidade celular foi expressa como % de aderência celular no óleo, a qual foi calculada usando a fórmula:  $BA (\%) = (1 - (Abs / 0,5)) \times 100$ , onde BA é aderência celular, Abs é a absorvância da suspensão após a agitação e 0,5 é a absorvância da suspensão antes da agitação. O experimento foi realizado em três experimentos independentes. Foram utilizados os solventes: Hexano e Xileno (Ismail e Dadasnia, 2015) e seus resultados estão descritos no item 5.7.

#### **4.15. Teste de detecção da produção de Biossurfactante (colapso de gota)**

O teste de produção de biossurfactante ocorreu primeiramente com o preparo do inóculo bacteriano como descrito para o perfil de crescimento bacteriano. Quando a cultura alcançou a fase exponencial de crescimento, a cultura foi transferida para falcons de 50 mL seguindo para a centrifugação, obtendo a recuperação da cultura bacteriana. Após esta etapa o sobrenadante foi reservado e deixado por uma hora em refrigeração a 4 °, visando uma boa separação do petróleo. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, a cultura foi separada do óleo e então centrifugada por 3 minutos a 10.000 rotações por minuto para a separação das células. O sobrenadante foi filtrado usando filtro de 0,20 µm de diâmetro (Millipore) no intuito de reter as células bacterianas. Após o filtrado, foram retirados 135 mL do sobrenadante livre de células com uma pipeta e aplicado sobre parafilme que foi estendido sobre uma superfície

plana para verificar a retenção da configuração da gota. Cada gota feita com o sobrenadante foi comparada as gotas feitas na mesma quantidade do controle. As gotas foram feitas em triplicatas e o experimento foi realizado em três experimentos independentes. Foram usados como controle: água destilada, SDS (dodecil sulfato de sódio) nas concentrações de 0,1, 1, e 10 % (modificado em Jain et al., 1991) e seus resultados estão descritos no 5.9.

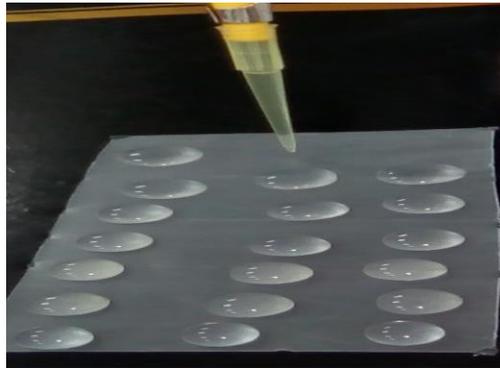


Figura 33: Formação das gotas pela adição do sobrenadante em parafilme

#### **4.16. Teste da redução da Tensão Superficial**

Vários procedimentos laboratoriais podem ser realizados para determinar a produção de biossurfactante, no entanto para a validação desta afirmação a tensão superficial precisa ser reduzida. Segundo BUENO (2008) surfactantes eficientes possuem uma baixa CMC (Concentração Micelar Crítica), isto é, menor quantidade de surfactante é necessária para o decréscimo da tensão superficial.

O método para esta investigação consiste no teste de redução da tensão superficial que utiliza o equipamento denominado Tensiômetro Kruss utilizando o método do anel de Du Nouy a 20° conforme Matsuura 2004.

Para esta etapa a cultura bacteriana foi preparada como descrito para o perfil de crescimento bacteriano, item 4.12. Foram preparadas triplicatas dos tempos de cultivo referente aos tempos: 1, 7 e 12 dias de cultivo, contemplando desta maneira a fase inicial ou aclimatação, fase exponencial e estacionária da cultura bacteriana.



Figura 34: Cultivo de UPC 3 em 7 dias para a realização dos testes de redução da Tensão Superficial

O teste de redução da tensão superficial ocorre com o uso do sobrenadante livre de células e de resíduos de óleo, para isso a cultura foi centrifugada a 4000 rpm a 4° por 30 minutos, em seguida a camada submersa de óleo foi retirada com papel filtro estéril e o sobrenadante foi transferido para tubos falcon de 50 mL, a centrifugação ocorreu por três vezes na intenção de eliminar as células e o petróleo.

Após estas etapas o sobrenadante de tempo 1 dia, foi filtrado em filtro de 0,20 µm de diâmetro (Millipore) e dos tempos de 7 e 12 foram primeiramente filtrados em filtro de 45 µm de diâmetro (Millipore) em seguida em filtro de 0,20 µm de diâmetro devido ao grande números de células que dificultaram a filtragem. Este processo tem como objetivo eliminar células e resíduos que podem alterar o resultado da redução da tensão superficial.

Os falcons contendo os filtrados foram transportados em caixa de isopor esterilizada e lacrada até a Universidade do Estado do Amazonas, na central Analítica da Universidade de tecnologia EST- UEA sob a orientação do professor Doutor Sérgio Duvoisin Junior.

Para o início desta etapa ligou-se o equipamento Tensiômetro, conforme as especificações, e acoplou-se neste o anel de platina que irá submergir na solução anteriormente filtrada. O método selecionado para esta análise foi o método do Anel de Du Nouy conforme Matsuura (2004).

Primeiramente mede-se em triplicata a densidade celular da água, a fim de usá-la como controle, em seguida da mesma maneira foram medidas as tensões superficiais do meio BH ao qual as bactérias foram cultivadas, e posteriormente foram medidas as tensões superficiais dos filtrados dos tempos 1, 7 e 12 dias. Para esta análise os filtrados foram colocados no suporte para líquido do tensiômetro, e medidas cinco vezes as tensões

superficiais pelo equipamento que finaliza retirando a média aritmética final. Todas as amostras foram feitas em triplicatas em experimentos independentes.

Os resultados obtidos pelo teste de redução da tensão superficial são descritos e discutidos no item 5.10.

#### **4.17. Tratamentos Estatísticos**

O tratamento de dados referente ao item 4.12, foram tratados pelo Microsoft Excel. Já os itens 4.13, 4.14, 4.16 foram tratados por one-way ANOVA (análise de variância) a 5 % de significância através do programa Past 3.12.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as seis coletas de cupins realizadas no Centro de apoio a pesquisa do Médio Solimões, foi selecionada a coletas UPC 3 (cupins da terceira coleta) retirada do solo, a mesma foi selecionada após observações diárias que apresentavam características de produção de biossurfactante pelo consórcio ali presente conforme descrito no item 4.4 e resumidos na tabela 07.

Tabela 7: Produção de Biossurfactantes em função do tempo

Tempo	UPC 1	UPC 2	UPC 3	UPC 4	UPC 5	UPC 6
24 horas			+++			++
48 horas						
72 horas						
96 horas			+++			
> 96 horas			++++		++	
Após 96 horas			++++	++	++	+++

++++: Alta produção de biossurfactante; +++: Média produção de biossurfactantes; ++ Produção intermediária de biossurfactantes.

As características relevantes para a seleção do consórcio UPC 3 consistiram na observação preliminar acerca da camada de petróleo contida no meio de cultivo e formação de espuma, que diante as demais coletas apresentou primeiramente mudanças físicas nesta camada. A camada oleosa foi transformada após o 7º dias de cultivo, o meio apresentou solubilização e grande turvação indicando crescimento da biomassa bacteriana. A partir deste dia (7º. Dias de cultivo) o consórcio UPC 3 também apresentou aspecto semelhante a produção de biossurfactante. Ao 12º dias de cultivo foi observada uma acentuação considerável indicando aumento na produção de biossurfactantes. Retirada uma alíquota de 1 mL do cultivo e transferido para um novo meio nas mesmas condições o consórcio UPC 3 manteve suas características iniciais e ao 21º dia além da produção de biossurfactante também apresentou total biodegradação da camada de petróleo. Segundo Ciapina (2008) os biossurfactantes podem ser produzidos “in situ” e ainda, a partir de substratos renováveis, como por exemplo, óleos vegetais, resíduos agroindustriais e subprodutos da indústria do petróleo e alimentícia.

Já a transformação da camada oleosa deve-se a capacidade que alguns microrganismos possuem em degradar este tipo de poluente (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Os morfotipos presentes em UPC 3, produziram biossurfactantes no objetivo de facilitar a biodegradação dos compostos hidrofóbicos presentes no petróleo. Bueno (2008) cita que muitas vezes os microrganismos produzem substâncias anfifílicas que são lançadas para fora da célula, a fim de facilitar a entrada de compostos pela membrana celular ou para aumentar a biodisponibilidade de um substrato no meio. As figuras 34 e 35, mostram o aumento da biomassa em um cultivo de tempo 7 dias do consórcio UPC 3 em comparação ao controle, e um cultivo de tempo 12 dias mostrando a ausência da camada oleosa e grande turvação do meio.



Figura 35: UPC3 C no 7º dias de cultivo e seu controle



Figura 36: UPC 3 em seu 12º dias de cultivo

### 5.1. Caracterização macroscópicas, microscópicas, e presença de cápsula do consórcio UPC 3

As linhagens microbianas provenientes de UPC 3 foram obtidas após processo de cultivo, diluição seriada e esgotamento por meio de estrias em meio PCA (meio agár padrão para contagem). Nesta coleta foram obtidos 3 morfotipos distintos após diluição seriada na placa  $10^{-4}$ , realizada em triplicata. Suas características macroscópicas, denominação, origem e detalhes das unidades formadoras de colônias (UFC) estão listados na tabela 08.

Tabela 8: Denominação e Caracterização macroscópicas das colônias

Denominação Inicial	Habitat	Nome dos morfotipos	Características Macroscópicas
UPC 3	Solo	UPC 3 A	Colônias médias, bordas regulares, crescimento abundante, com relevo, coloração bege.
		UPC 3 B	Colônias pequenas, esféricas, sem relevo, cor amarelo bege, escassa em PCA.
		UPC 3 C	Colônias grandes, espalhadas, bordas irregulares, sem relevo, cor amarelo claro.

A coloração de Gram permitiu a identificação dos microrganismos que em colônia podem apresentar formas esféricas (cocos), cilíndricas (bacilos) ou espiraladas (espirilos). Nesta análise também foi investigada a presença ou não de cápsula nos morfotipos selecionados. Os detalhes revelados pela coloração de Gram dos morfotipos encontrados nos cupins da coleta UPC 3 estão descritos na tabela 09.

Tabela 9: Resultado da Coloração de Gram em alguns microrganismos

Coleta	Linhagens	Coloração de Gram	Morfologia das células	Arranjos característicos	Cápsula
UPC 3	UPC 3 A	+	Bacilos	Bacilos isolados	Ausência de Cápsula
	UPC 3 B	+	Bacilos	Bacilos	Presença de Cápsula
	UPC 3 C	-	Bacilos	Bacilos isolados	Presença de cápsula

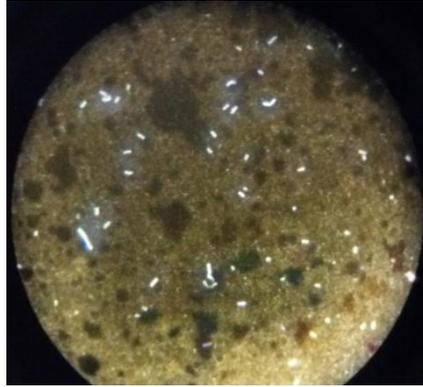


Figura 37: Teste de Cápsula detectando sua ausência em UPC3 A



Figura 38: Caracterização microscópica em UPC3 C



Figura 39: Caracterização microscópica em UPC3 A

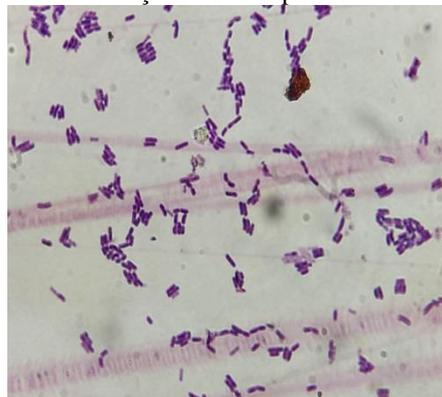


Figura 40: Detalhes dos arranjos em UPC3 B



Figura 41: Teste de cápsula detectando sua presença em UPC3 C

O teste para a verificação de cápsula revelou que o morfotipo UPC3 A não possuem cápsula. Em contrapartida, os microrganismos denominados UPC3 B e UPC3 C é encapsulado.

Mesmo em condições semelhantes de cultivo contendo petróleo, os microrganismos se diferenciam em amplos sentidos, onde UPC3 A pode ter ao longo do processo evolutivo, adquirido ou perdido habilidades conforme sua condição e necessidade do meio onde viviam.

O trato digestivo de um cupim era o meio onde viviam UPC3 A, UPC3 B e UPC 3C, mudando drasticamente para um ambiente artificial contendo meio mínimo e petróleo. Estas características condizem com a observação citada por Neto (2015), diante de dados da literatura que mostram quando as condições no ambiente de biodegradação mudam, pode haver alterações na morfologia do microrganismo para garantir melhor utilização das fontes de energia no seu ambiente.

A cápsula é uma característica evolutiva de microrganismos que vivem em condições desfavoráveis, ou em meios contendo petróleo.

Segundo Neto (2015), a cápsula é importante para a efetiva colonização, aderência e prevenção à dessecação das células que o possuem. Pesquisas apontam que existe maior probabilidade das bactérias Gram negativas possuírem este componente, destacando que a presença deste item pode lhes conferir vantagens como: proteção à desidratação, proteção ao ataque de bacteriófagos, favorece a aderência ao substrato e evita que nutrientes se movam para fora da célula (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Por possuir cápsula e por ser classificada como bactéria Gram negativa, UPC3 C possui vantagem significativa em termos de competitividade e sensibilidade, conforme Matsuura (2004) ressalta que bactérias Gram-positivas apresentam maior sensibilidade aos biosurfactantes, já bactérias Gram-negativas são inibidas fracamente ou não são inibidas.

## 5.2. Identificação de cupins pertencentes à UPC 3

Os térmitas presentes na coleta UPC 3 foram identificados através de observações em lupa de sua morfologia. Estes cupins revelaram características como: presença de fontanela, esporões apicais da tíbia, mandíbula esquerda com um ou dois dentes marginais, asas não reticuladas (reprodutores), escama alar posterior não recobrindo a anterior e pronoto em forma de sela, com um lobo anterior bem definido, segundo Constantino (2012) e figuras 41 e 42. Portanto os cupins da coleta UPC3 C são pertencentes à família dos Termitidae, reino Animalia, divisão Arthropoda, classe Insecta, e ordem Isóptera.



Figura 42: Indivíduos identificados de UPC 3



Figura 43: Cupins da família Termitidae presentes em UPC3 C

De acordo com Zanetti (2009), Termitidae é a principal família de cupins, com presença de fontanela; asas com as escamas aladas anteriores curtas ou do mesmo tamanho das posteriores; soldados com projeção ou lobo anterior no pronoto em forma de sela; apresentam dentes mandibulares basais desenvolvidos; constroem diferentes tipos de ninhos e possuem hábitos alimentares variados, como, por exemplo, madeira, folha, húmus e etc. existem espécies que são cultivadores de fungos; no entanto, em condições brasileiras isto não ocorre. Os principais gêneros são: *Cornitermes*, *Nasutitermes*, *Syntermes* e *anoplotermes*.



Figura 44: Detalhes da morfologia dos Termitidae presente em UPC3 C

Tórax com projeção anterior



Termitidae

Figura 45: Desenho esquemático para identificação de Termitidae  
Fonte: Zanetti (2009)

### 5.3. Seleção de UPC3 C como consórcio microbiano produtor de Biosurfactante

Do consórcio UPC 3 foram isolados três morfotipos distintos denominados UPC3 A, UPC3 B e UPC3 C. Os mesmos foram mantidos em condições semelhantes de cultivo conforme o item 4.2. Após o período de incubação, o frasco contendo o microrganismo UPC3 C demonstrou maior evidência na produção de biosurfactante baseado na formação de espuma em comparação aos demais microrganismos.

### 5.4. Identificação Molecular de UPC3 C

Esta etapa do processo de identificação molecular utilizou o primer 1492 R com iniciador 16 S Reverse visando a amplificação do Dna bacteriano. O tratamento da sequência obtida revelou um fragmento de 463 pares de base. Esta sequência foi alinhada no banco de dados genéticos NCBI através do programa de busca de dados genéticos BLAST, mostrando que a linhagem UPC3 C apresenta uma porcentagem de 100% de identidade, e-value 0.0 e Query Cover 100% para a bactéria *Psychrobacillus psychrodurans*.

### 5.5. Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos de *Psychrobacillus psychrodurans*

Os microrganismos podem ser classificados como resistentes, resistentes intermediários e sensíveis. Esta classificação baseia-se no tamanho dos halos contidos nas placas com o microrganismo. As placas com os antibióticos de multidiscos negativos contendo a bactéria *Psychrobacillus psychrodurans* apresentaram os valores numéricos dos diâmetros dos halos no anexo 07. Os antibióticos do multidiscos e suas concentrações são: cefoxitina 30 µg, amoxicilina 30 µg, cefuroxima 30 µg, cefatolina 30 µg, ampicilina 10 µg, meropenem 10 µg, ceftazidima 30 µg, cefepima 30 µg, ciprofloxacina 5 µg, sulfametoxazol + trimetopim 25 µg, amicacina 30 µg, gentamicina 10 µg.

Tabela 10: Resultado em relação ao tamanho do halo

Ordem	Antibiótico	Concentração (µg/disco)	Sigla	Halos obtidos (mm)	Resultado	Parâmetros para resultados			Classe de antibióticos
						Resistente (R)	Intermediário (I)	Sensível (S)	
01	Cefoxitina	30	CFO	40	S	≤ 14	15-17	≥ 18	Cefalosporinas 4 <sup>o</sup> geração
02	Amoxicilina	30	AMC	41	S	≤ 13	14-16	≥ 17	Penicilinas
03	Cefuroxima	30	CRX	41	S	≤ 14	15-17	≥ 18	Cefalosporinas 2 <sup>o</sup> geração
04	Cefalotina	30	CFL	42	S	≤ 14	15-17	≥ 18	Cefalosporinas 2 <sup>o</sup> geração
05	Ampicilina	10	AMP	40	S	≤ 13	14-16	≥ 17	Penicilinas
06	Meropenem	10	MER	32	S	≤ 13	14-15	≥ 16	Carbapenens
07	Ceftazidima	30	CAZ	17	R	≤ 17	18-20	≥ 21	Cefalosporinas 3 <sup>o</sup> geração
08	Cefepima	30	CPM	29	S	≤ 14	15-17	≥ 18	Cefalosporinas 4 <sup>o</sup> geração
09	Ciprofloxacina	5	CIP	28	S	≤ 15	16-20	≥ 21	Quinolonas
10	Sulfametoxazol + trimetopim	25	SUT	42	S	≤ 10	11-15	≥ 16	Inibidores da via metabólica do folato
11	Amicacina	30	AML	34	S	≤ 14	15-16	≥ 17	Aminoglicosídeo
12	Gentamicina	10	GEN	33	S	≤ 12	13-14	≥ 15	Aminoglicosídeo

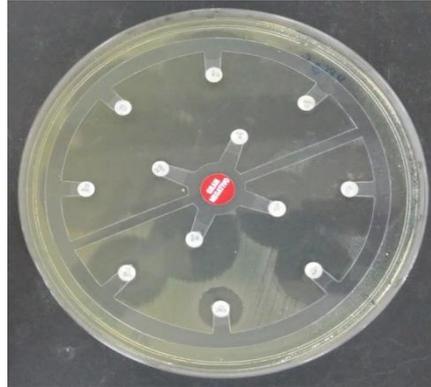


Figura 46: Detalhes mostrando na margem inferior o halo obtido no disco antimicrobiano de CAZ 30 por *Psychrobacillus psychrodurans*

Dentre os antimicrobianos testados os mais eficientes em inibição do halo foi o Sulfametoxazol + Trimetopim e Cefalotina com halos de 42 mm, o segundo mais eficiente foi foram os antimicrobianos amoxicilina e cefuroxima com halos medindo 41 mm cada, seguidos de Cefoxitina e Ampicilina com halos de inibição medindo 40 mm. Os demais antimicrobianos apresentaram halos medindo entre 17 e 37 mm.

Com isso, dos dados obtidos na tabela 10, observa-se que a bactéria *Psychorobacillus psychrodurans* apresentou resistência a apenas um antimicrobiano, o Ceftazidina (ordem 7 na tabela 10) na concentração de 30 ug/disco, pois o halo de inibição mediu 17 mm alcançando a margem de microrganismo resistente. No entanto os halos obtidos nos demais antimicrobianos apresentaram sensibilidade do microrganismo, como mostrados na figura 46.

É importante frisar que a introdução de um microrganismo no meio ambiente, ou em contato com pessoas ou animais, deve-se primeiramente conhecer sua identidade e sua resistência ou sensibilidade a antimicrobianos. Um microrganismo biodegradador de compostos de petróleo, por exemplo, deve atender aos requisitos de segurança, não devendo causar danos ao ambiente e as pessoas. Pensando nisso verifica-se a importância do teste de sensibilidade a antimicrobianos, que descreve se determinado microrganismo está apto ou não de ser usado em processos como o de Biorremediação.

No entanto em termos de competição, microrganismos produtores de biossurfactantes destacam-se positivamente em relação aos demais microrganismos, pois possuem atividade antimicrobiana devido à produção do tensoativo, conforme Santana (2012); a atividade

antibiótica é uma função demonstrada por vários biossurfactantes, principalmente da classe dos lipopeptídeos e glicopeptídeos. A surfactina de *B. subtilis* e os ramnolipídeos de *P. aeruginosa*, funcionam como antibióticos solubilizando os principais componentes das membranas celulares microbianas. Através da excreção destes biossurfactantes no meio, os microrganismos adquirem maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes (Lin, 1996).

### 5.6. Perfil de Crescimento Microbiano de *Psychrobacillus psychrodurans*

A curva de crescimento da bactéria *Psychrobacillus psychrodurans* teve duração de 70 dias. Neste período foram conhecidas as fases de crescimento microbiano como aclimação (fase lag), crescimento exponencial (log), estacionária e declínio. O objetivo consistia na detecção de início da fase exponencial de crescimento, pois segundo Matsuura (2004) em cultura de microrganismos a maior quantidade de biossurfactante é liberada na fase exponencial de crescimento. A curva de crescimento microbiano está representada na figura 47.

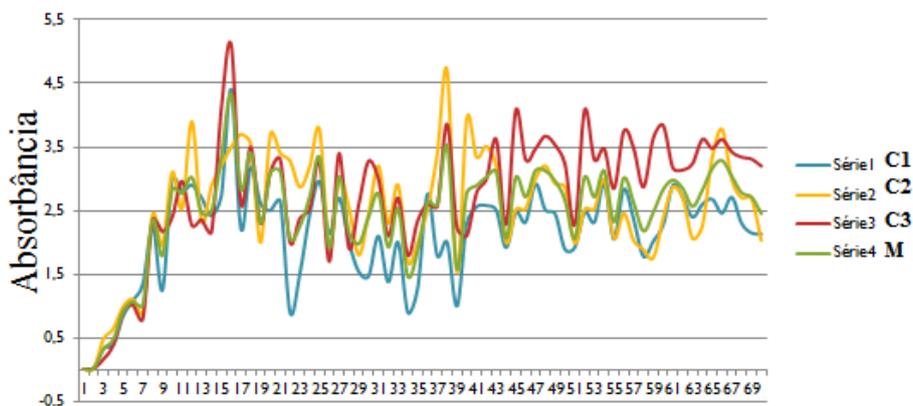


Figura 47: Gráfico do perfil de Crescimento Microbiano

Na figura 47, a linha em verde indica o valor da média aritmética obtida nas leituras realizadas nas triplicatas referentes aos três frascos contendo *Psychrobacillus psychrodurans*

A fase de aclimação do microrganismo iniciou no primeiro dia e finalizou no quinto dia. Neste intervalo a bactéria *Psychrobacillus psychrodurans* teve seu crescimento reprodutivo com valores razoavelmente baixos iniciando com 0,01 no primeiro dia de cultivo, seguindo de 0,02 no segundo dia de cultivo, valores baseados na média aritmética. A partir do quinto dia de cultivo houve o início da fase exponencial de crescimento que durou aproximadamente 6 dias. Posteriormente o microrganismo entrou na fase estacionária de

crescimento com início no 12º dia de cultivo, o microrganismo se manteve estável com números aproximados de reprodução de indivíduos e morte.

A fase de declínio ou morte celular não foi observada, pois não era alvo de investigação neste trabalho.

### 5.7. Teste de Hidrofobicidade Celular

Os testes de hidrofobicidade celular de *Psychrobacillus psychrodurans* foram realizados na fase exponencial de crescimento microbiano (7º dia), conforme o item 4.14, e os valores da absorbância estão descritos em anexo 04, através da equação  $BA (\%) = (1 - (Abs / 0,5)) \times 100$ , onde BA é a aderência celular, Abs refere-se a absorbância da suspensão antes da agitação.

O teste de Tukey sinaliza uma diferença significativa entre os experimentais: xileno e hexano, e petróleo e xileno, conforme a tabela 11, que evidencia valores menores que 0,05 em p-Value.

Tabela 11: Resultados obtidos baseados no teste de Tukey

Solventes	Hexano (p-Value)	Xileno (p-Value)	Petróleo (p-Value)
Hexano		0,0001297	0,0831
Xileno	9,639		0,0001291
Petróleo	3,182	12,82	

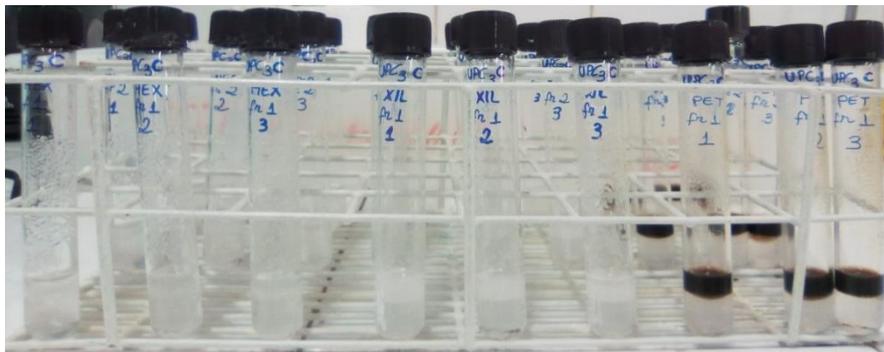


Figura 48: Frascos em repouso após agitação em vortex

A interação entre a célula e os compostos apolares pode ser aumentada a partir da Hidrofobicidade celular da célula em análise. Tal interação favorece a disponibilidade do componente hidrofóbico as células microbianas, favorecendo seu crescimento.

Segundo Obuekwe et al., (2009), a hidrofobicidade celular pode ser compreendida como uma afinidade da superfície celular a contaminantes orgânicos apolares. Desse modo, os micro-organismos podem aumentar sua hidrofobicidade celular, objetivando uma maior interação com a fonte de carbono e energia, como no caso do petróleo.

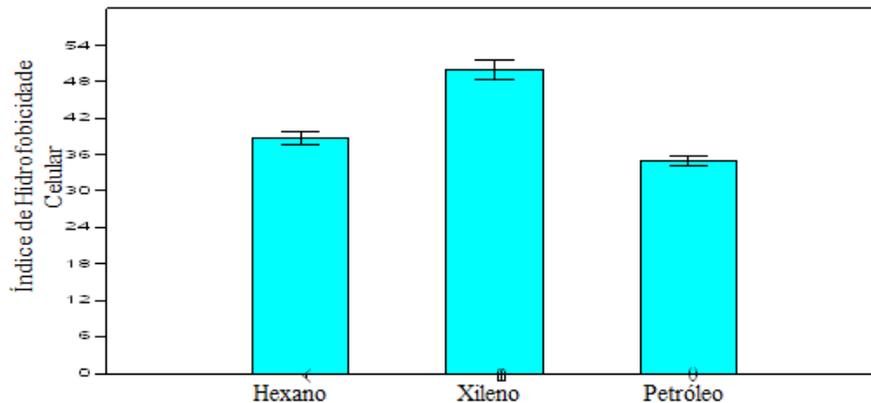


Figura 49: Gráfico de Hidrofobicidade Celular e desvio padrão

A figura 49 corrobora com a significância obtida entre o experimental xileno e hexano, e petróleo e xileno. Os solventes xileno e petróleo são compostos de características apolares, similar aos componentes do petróleo utilizado neste teste. No entanto a hidrofobicidade celular permitiu a interação entre as células de *Psychrobacillus psychrodurans* aos componentes apolares.

Segundo Nitschke e Pastore (2002) a aderência/liberação da célula a superfícies é uma das mais importantes estratégias de sobrevivência dos microrganismos e sua habilidade em colonizar um nicho ecológico onde possa se multiplicar.

Desta forma, os microrganismos podem utilizar os surfactantes ligados a sua parede celular para regular as propriedades da superfície celular, visando se aderir ou se desligar de um determinado local de acordo com sua necessidade para encontrar novos habitats com maior disponibilidade de nutrientes ou se livrar de ambientes desfavoráveis, (Nitschke e Pastore 2002).

### 5.8. Avaliação da produção de Biosurfactante através da Atividade Emulsificante de sobrenadante da cultura bacteriana de *Psychrobacillus psychrodurans*

A atividade emulsificante consiste em um dos métodos de avaliação de produção de biosurfactante. O índice de emulsificação foi calculado usando a fórmula  $E (\%) = He/Ht \times 100$ , onde He (altura da emulsão) e Ht (altura total). Os valores medidos de He e Ht estão

presentes na tabela em anexo 02. Os valores referentes aos índices de emulsificação estão descritos na tabela 12.

Tabela 12: Resultados obtidos baseados no teste de Tukey

Solventes	Hexano (p-Value)	Xileno (p-Value)	Petróleo (p-Value)
Hexano		0,5047	0,0006725
Xileno	1,6		0,0001601
Petróleo	6,201	7,801	

As emulsões formadas após agitação dos solventes (hexano e xileno), petróleo e sobrenadante proveniente da bactéria *Psychrobacillus psychrodurans* são demonstradas nas figuras 50, 51 e 52, onde observa-se claramente a emulsão formada na presença do sobrenadante bacteriano em comparação aos controles.

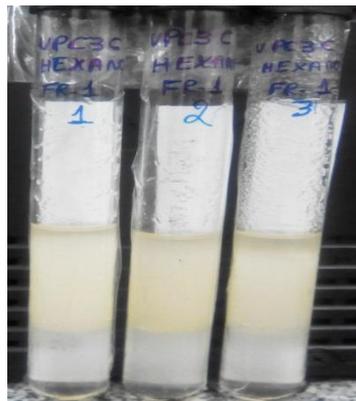


Figura 50: Alturas da emulsão formada em experimental contendo sobrenadante e solvente Hexano



Figura 51: Alturas da emulsão formada em experimental contendo sobrenadante e solvente Xileno



Figura 52: Controles

Segundo o teste Tukey, há diferenças significativas entre os experimentos petróleo e hexano e entre petróleo e xileno. Essa afirmação consiste nos valores de p-Value menores que 0,05, corroborados em um gráfico de barras com respectivos desvios padrões que não se sobrepõem conforme figura 53.

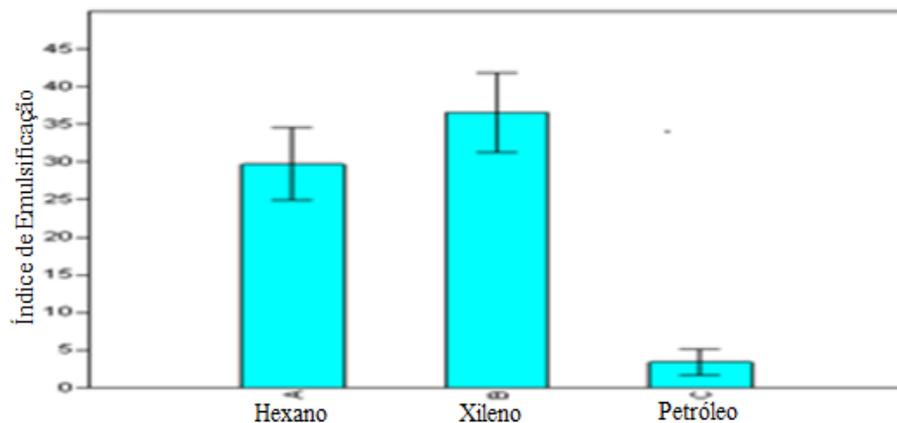


Figura 53: Gráfico obtido através do teste de Atividade Emulsificante

Segundo CRUEGER & CRUEGER, 1984; FIECHTER (1992). Os surfactantes apresentam propriedades que facilitam a formação de uma emulsão devido à capacidade de reduzir a tensão superficial entre as duas fases distintas, estabilizando a emulsão formada.

### 5.9. Detecção de produção de Biossurfactante (Colapso de Gota)

O teste de detecção de produção de biossurfactante baseou-se na comparação do tamanho das gotas entre: gotas de água; experimental C1, C2, C3 (contendo o sobrenadante de *Psychrobacillus psychrodurans*) e controles SDS (dodecil sulfato de sódio) em diluições nas concentrações de 0,1 %, 1% e 10 % conforme imagem 54.

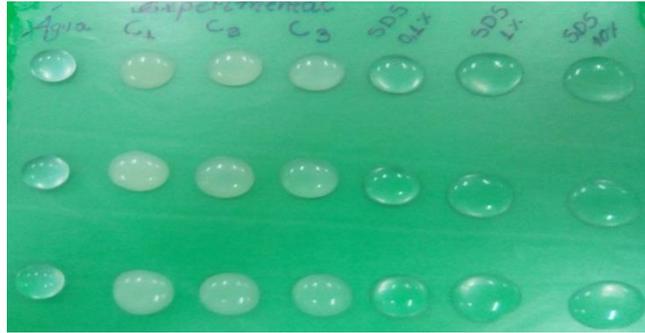


Figura 54: Tamanho das gotas do sobrenadante em comparação ao controle SDS

Na imagem 54 percebe-se que o tamanho das gotas de sobrenadante C1, C2 e C3 possuem diâmetro maior que a gota de água, e diâmetro similar ao controle SDS 0,1 %. Essa similaridade ao SDS indica produção de biossurfactante de 0,1 % comparado ao surfactante sintético. Este experimento evidencia redução da tensão superficial entre as moléculas do grupo experimental devido ao aumento da área superficial das gotas de óleo, ocasionando o aumento no diâmetro das gotas, permitindo também o acesso dos microrganismos ao substrato, permitindo o aumento na biomassa bacteriana.

### 5.10. Teste de Redução da Tensão Superficial

A tensão superficial do biossurfactante produzido por *Psychrobacillus psychrodurans* foi avaliado pelo método do anel de Du Nouy, seus sobrenadantes livres de célula apresentaram redução da tensão superficial em comparação a tensão superficial da água com densidade de 72 mN/m, utilizada como controle. Os valores referentes ao cultivo de 1 dia (24 horas), 7 dias (168 h) e 12 dias (288 h) estão listados na tabela 13.

Tabela 13: Resultados baseados no teste de Tukey

Tempo	1 dia (p-Value)	7 dias (p-Value)	12 dias (p-Value)
1 dia		0,0002269	0,0002269
7 dias	44,39		0,0002549
12 dias	27,8	16,6	

De acordo com o teste de Tukey houve diferenças significativas em termos de redução da tensão superficial entre os cultivos de tempos 1 e 7 dias, 1 e 12 dias, e entre 7 e 12 dias.

Este fato fica evidente ao observarmos a tabela em anexo 06, que evidência a maior redução da tensão superficial na fase exponencial de crescimento de *Psychrobacillus*

*psychrodurans*, e um aumento da tensão superficial no tempo de 12 dias referente à fase estacionária do microrganismo. Georgiou, Lin e Sharma (1992) em estudos envolvendo produção de biossurfactantes por *Bacillus licheniformes* observaram que o biossurfactante produzido alcançou seu máximo em termos de produção até a metade da fase exponencial e subsequentemente decrescendo rapidamente, provavelmente porque é convertido em um metabólito sem atividade surfactante (Matsuura, 2002).

Outra colaboração que explica o aumento da tensão superficial na fase estacionária, segundo Makkar e Rockne (2003) cita que o biossurfactante também é uma fonte de carbono e muitas vezes mais assimilável que a fornecida para a sua produção, portanto, o aumento na tensão superficial pode ser explicado pelo fato dos isolados possivelmente terem consumido o biossurfactante por elas inicialmente sintetizado, permitindo assim a continuidade do crescimento dos isolados, conseqüentemente aumentando a tensão superficial.

Este fator reforça o que Matsuura (2004) cita sobre a maior concentração de biossurfactantes é liberada na fase exponencial de crescimento de microrganismos, evidenciando também que certos biossurfactantes são produzidos em uma parte do processo de crescimento, sendo depois desativado ou transformado em outro metabólito sem atividade surfactante.

É importante frisar que na fase exponencial houve maior redução da tensão superficial em comparação aos demais tempos de cultivo e ao controle, e esta redução está diretamente relacionada à formação de micelas formadas por monômeros de surfactante. Segundo (LIN, 1996); a Concentração Micelar Crítica (CMC) é o parâmetro mais utilizado para avaliar a atividade surfactante, reconhecido como a solubilidade de um surfactante dentro da fase aquosa ou a concentração mínima requerida para atingir a menor tensão superficial (Santana, 2012).

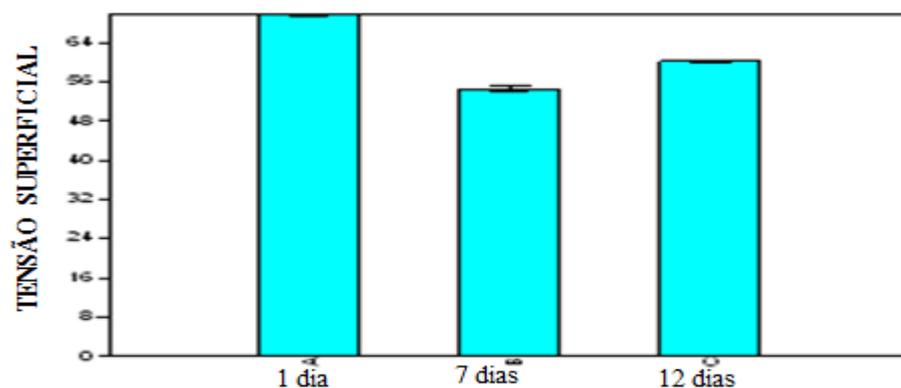


Figura 55: Gráfico referente aos valores de Redução da Tensão Superficial

A figura 55 reforça os valores de redução da tensão superficial evidenciando seus referidos desvios padrões.

## CONCLUSÃO

- Dentre as seis coletas de isópteros realizadas, a coleta UPC 3 evidenciou em 24 h de cultivo produção de biossurfactantes na presença de petróleo dentre as demais coletas;
- Os isópteros coletados pertencem à família dos Termitidae;
- Através da caracterização macroscópica obteve-se 3 (três) morfotipos distintos provenientes de UPC 3, denominados UPC3 A, UPC3 B e UPC3 C;
- Pela análise individual de produção de biossurfactantes, a coleta UPC3 C foi selecionada como microrganismo produtor de biossurfactante;
- A análise microscópica revelou que UPC3 C é um microrganismo Gram Negativo, na forma de bacilos, possuindo colônias grandes, espalhadas, com bordas irregulares, sem relevo, e coloração amarelo claro;
- O teste de presença de cápsula revelou que UPC3 C é um microrganismo capsulado;
- Através da identificação molecular por sequenciamento do Gene 16S rRNA, obteve-se a identificação da linhagem anteriormente chamada de UPC3 C como a bactéria *Psychrobacillus psychrodurans* através da sequência obtida e depositada no banco de dados NCBI;
- O teste de sensibilidade a antimicrobianos revelou que *Psychrobacillus psychrodurans* é resistente ao antimicrobiano Ceftazidima (CAZ), com concentração 30 µg/disco, com halo de inibição de 17 mm, e sensível aos demais antimicrobianos.
- O perfil de crescimento microbiano destacou as fases de crescimento de *Psychrobacillus psychrodurans*, onde a fase de aclimatação da bactéria ao meio de cultivo durou de 1 a 5 dias, a fase exponencial de crescimento foi observada a partir do quinto dia de cultivo perdurando até o 11º dias de cultivo, seguidos da fase estacionária observada até o 70º dias de cultivo. A fase de declínio não foi observada.
- Na análise de Hidrofobicidade celular utilizando o teste de Tukey, houveram evidências que sinalizavam uma diferença significativa entre os experimentais: xileno e hexano, e petróleo e xileno, através dos valores menores que 0,05 em p-Value.
- A avaliação de produção de biossurfactante através da atividade emulsificante revelou, segundo o teste de Tukey, diferenças significativas entre os experimentos petróleo e hexano e entre petróleo e xileno, onde observou-se valores menores de p-Value de 0,05.

- A detecção de produção de biossurfactante pelo método do colapso de gota revelou que a bactéria *Psychrobacillus psychrodurans* produz biossurfactante a 0,1 % comparado as gotas de SDS nesta diluição.
- A redução da tensão superficial pelo sobrenadante de *Psychrobacillus psychrodurans* em tensiômetro pelo método do anel de Du Nouy nos tempos de cultivo 1,7 e 12 dias, evidenciaram redução da tensão segundo teste de Tukey uma diferença significativa entre os cultivos de tempos 1 dia e 7 dias, 1 dia e 12 dias e entre 7 dias e 12 dias. Com destaque ao sétimo dia de cultivo que apresentou em seu 1º dia tensão superficial de 72 mN/m, reduzindo para 54,6 mN/m no sétimo dia de cultivo.

## REFERÊNCIAS

- ABE, T. 1987. Evolution of the life types in termites. In Evolution, coadaptation, and biotic communities (S. Kawano, J.H. Connell & T. Hidaka, eds). University of Tokyo Press, Tokyo, p.128-148.
- AL-BAHRY, N.; AL-WAHAIBI, Y. M.; ELSHAFIE, A. E. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery, *International Biodeterioration Biodegradation*, vol.81, p.141–146, 2013.
- AQUINO, Adriana Maria; CORREIA, Maria Elisabeth Fernandes; MENEZES, Elen de Lima. Associação entre térmitas e microrganismos. Embrapa, documento 254, Seropédica, RJ, 2008.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 53, p. 495-508, 2000.
- BARROS, Francisco Fábio Cavalcante; QUADROS, Cedenir Pereira de; MARÓSTICA JUNIOR, Mário Roberto; PASTORE, Gláucia Maria. Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova*, v. 30, 2007.
- BRANDA, S. S.; GONZALEZ-PASTOR, J. E.; BEN-YEHUDA, S.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proceedings of National Academy of Science of USA*. v. 98, p. 11621-11626, 2001.
- BRAUD, A.; JÉZÉQUEL, K.; LÉGER, M.; LEBEAU, T. Siderophore Production by Using Free and Immobilized Cells of Two Pseudomonads Cultivated in a Medium 79 Enriched with Fe and/or Toxic Metals (Cr, Hg, Pb). *Biotechnology and Bioengineering*, v. 94, n. 6, p.1080-1088, ago, 2006.
- BUZZI, Z. J.; MIYAZAKI, R. D. *Entomologia Didática*. 3 ed. Curitiba: UFPR, 1999. 306 p.
- COOPER, D. G.; ZAJIC, E. Surface-active compounds from microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*. v. 26, p. 229- 253, 1980.
- BOOPATHY, R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74: 63-67.

BODOUR, A; DREES, K. P.; MAIER, R. M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, n. 6, p. 3280-3287, 2003.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces - A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v. 152, p. 41- 52,1999.

BUENO, Silvia Messias. Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo. Tese de Doutorado. UEP, 99 p. 2008.

CAMEOTRA, S.S. & SINGH, P. 2009. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. *Microbial Cell Factories*, 8:16.

CLEVELAND, L.; HALL, S.R.; SANDERS, E.P. & COLLIER, J. 1934. The wood-feeding roach *Cryptocercus* , its Protozoa, and the symbiosis between Protozoa and roach. *Mm. Acad. Arts Sci*. 17:185-342.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial Surfactants and Their Use in Field Estudies of Soil Remediation. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, p. 915-929, 2002.

CIAPINA, Elisa Mara Prioli. Producao de biossurfactantes *rhodococcus erythropolis* em biorreator de bancada e avaliação do seu efeito na biodegradação de borra oleosa da indústria do petróleo. Tese de doutorado, UFRJ, (2008).

COSTA-LEONARDO, A.M. 2002. Cupins-praga: morfologia, biologia e controle. Ana Maria Costa-Leonardo, Rio Claro.

COSTA LIMA, A. Insetos do Brasil. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1938, 470 p.

COX. Michael; DOUDNA, Jennifer A; O'DONNELL, Michael. *Biologia Molecular: Princípios e Técnicas*. ArtMed, 2012.

CONSTANTINO, R. Isóptera. in: CONSTANTINO, R.et al. *Insetos do brasil: diversidade e taxonomia*. Ribeirão Preto: Holos , Editora Ltda-ME, 2012. p. 311- 321.

DAVEY, M. E.; CAIAZZA, N. C.; TOOLE, G. A. O. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*. v. 185, p. 1027-1036, 2003.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. *Comptes Rendus Chimie*. v. 7, p. 641-646, 2004.

GRASSÉ, P.P. 1986. *Termitologia*. Masson, Paris, Tomo 3.

GRIFFITHS, Anthony J. F; WESSLER, Susan R; LEWONTIN, Richard C; CARROLL, Sean B. *Introdução a Genética*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

HARRIS, W. V. *Termites: their recognition and control*. London: Longman, 1971. 186 p.

HONG, K.; TOKUNAGA, S.; KAJIUCHI, T. Evaluation of Remediation Process With Plant-Derived Biosurfactant for Recovery of Heavy Metals from Contaminated Soils. *Chemosphere*, v. 49, p. 379-387, 2002.

KIM, H. S.; YOON, B. D.; LEE, C. H.; SUH, H. H.; OH, H. M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and Properties of a Lipopeptide Biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *Journal Fermentation Bioengineering*, v. 84, p. 41-46, 1997. *ineering*, v. 84, p. 41-46, 1997.

KRISHNA, K. 1969. Introduction. In *Biology of termites* (K. Krishna & F.M. Weesner, eds.). Academic Press, New York, v.1, p.1-17.

KUYUKINA, M. S.; IVSHINA, I. B.; PHILP, J. C. Recovery of Rhodococcus Biosurfactants Using Methyl Tertiary-Butyl Ether Extraction. ***Journal of Microbiological Methods***, v. 46, p. 149-156, 2001.

LANG, S. Biological Amphiphiles (Microbiol Biosurfactants). *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 7, p. 12-20, 2002.

LANGE, Carla C; BRITO, Maria A. V. P; BRITO, José R. F; ARCURI, Edna F; SOUZA, Guilherme, N; MACHADO, Marco A; DOMINGUES, Robert; SALIMENA, Alessandra P. S. *Uso de PCR e Sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero Staphilococcus isolada de mastite bovina*. Minas Gerais: 2010.

LE CLAINCHE, L.; FIGUET, M.; MONTJARDET-BAS, V.; BLANCHARD S.; VITA, C. Modulating the Affinity and the Selectivity of Engineered Calmodulin EFHand Peptides for Lanthanides. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 95, n. 1, p. 29-36, sep. 2006.

- LENZ, M. 1994. Food resources, colony growth and caste development in wood-feeding termites. In *Nourishment and evolution in insect societies* (J.H. Hunt & C.A. Nalepa, eds). Westview Press, Boulder, p.159-210.
- LIN, S. C. Biosurfactants: Recent Advances. *Journal Chemistry Technology and Biotechnology*, v. 66, p. 109-120, 1996.
- LIMA, Juliana Toledo; LEONARDO, Ana Maria Costa. Recursos alimentares explorados pelos cupins (Insecta: Isóptera). Rio Claro: 2007.
- MAIER, R. M. Biosurfactants: Evolution and diversity in bacteria. *Advances in Applied Microbiology*. v. 52, p. 101-121, 2003.
- MAHON, C. R; MANUSELIS, G. Jr. *Textbook of diagnostic microbiology*; Saunders Co, Philadelphia, 1997.
- MAKKAR, R.S.; ROCKNE, K.J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Toxicol Chem*. n. 22. p. 2280–2292. 2003.
- MATSUURA, Ani Beatriz Jackisch. Produção e caracterização de Biossurfactante visando a aplicação industrial em processos de Biorremediação. Tese de Doutorado, Unicamp, 98 p. 2004.
- MARZZOCO, Anita; TORRES, Bayardo B. *Bioquímica Básica*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- MEDEIROS, João Bosco. *Redação Científica: Prática de Fichamentos, Resumos, Resenhas*. 11. ed. São Paulo: Atlas, 2013.
- MESQUITA, A. C. Uso das Técnicas de Oxidação Química e Biodegradação na Remoção de Alguns Componentes Recalcitrantes. Tese de Doutorado, UFRJ. 158 p. 2004.
- MILLIOLI, Valéria Souza; FLAVIA, Eliana C; SOBRAL, Sergio Luiz Gonzaga; CARVALHO, Denize Dias. Biorremediação de solo contaminado com óleo cru: Avaliação da adição de Ramnolipídeos quanto à toxicidade e a eficiência de biodegradação. Rio de Janeiro: 2007.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N. & GIBBS, B.F. 2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*.

NETO, Júlio Nino de Souza. Perfil proteômico de *acinetobacter junii* cultivada em petróleo e diesel. Dissertação de mestrado, Ufam, 119 p. 2015

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2002. Campinas SP.

PELCZAR, Michael J; CHAN, E. C. S; KRIEG, Noel R. Microbiologia: Conceitos e Aplicações. 1 ed. São Paulo: Pearson Makron Books, 1997.

RAFAEL, José Albertino; MELO, Gabriel A. R; CARVALHO, Cláudio J. B; CASARI, Sônia A; CONSTANTINO, Reginaldo. Insetos do Brasil. Ribeirão Preto: Holos, 2012.

REIS, R. S.; PACHECO, G. J.; PEREIRA, A. G.; FREIRE, D. M. G. Biosurfactants: Production and Applications, Biodegradation - Life of Science, Dr. Rolando Chamy (Ed.), InTech, 2013, v. 01, p. 1-370, 2013.

RICHTER, M.; WILLEY, J. M.; SUSSMUTH, R.; JUNG, G.; FIEDLER, H. P. Streptofactin, a novel biosurfactant with aerial mycelium inducing activity from *Streptomyces tendae* Tu 901/8c. FEMS Microbiology Letters. v. 163, p.165-171, 1998.

RON, E.Z. & ROSENBERG, E. 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, 3 (4): 229-236.

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

SANTOS, B. N; LEMOS, J. A. M; LEMOS, S; PARENTE, A; DE FRANÇA, Í. W. I; MELO, V. M. M; BATISTA, H; GONÇALVES, L. R. B. Estabilidade de Biossurfactante Bacteriano do tipo lipopeptídeo frente as variações de temperatura, pH e concentrações salinas. Ceará: 2014.

SANTANA, Willma José. Produção de biossurfactante por *candida lipolytica* (upc 0988) utilizando óleo de pequi como fonte alternativa de carbono. Tese de doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

- SHAFI, R.; KHANNA, S. Biosurfactant. *Indian Journal of Microbiology*, v. 35, p. 165-184, 1995.
- SILVA, Thiago Antônio Cavalcanti. Revisão acerca da Biorremediação em solos contaminados por petróleo. Rio de Janeiro: 2012.
- SILVEIRA, Érico Leandro da. Identificação de comunidades bacterianas de solo por sequenciamento do gene 16S rRNA. Jaboticabal SP: 2004.
- SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Enhancement of Metal Bioremediation by Use of Microbial Surfactants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 329, p. 291-297, 2004.
- SEO, J.; KEYN, Y & LI, Q.X. 2009. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health* . 6: 278-309.
- SULLIVAN, E. Molecular Genetics of Biosurfactant Production. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 9, p. 263-269, 1998.
- TABATABAEE, A.; MAZAHARI ASSADI, M.; NOOHI, A.A. & SAJADIAN, V.A.2005. Isolation of biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. *Iranian Journal of environmental health, Science and Engineering*, 2(1): 6-12.
- TAYASU, I., ABE, T., EGGLETON, P. & BIGNELL, D.E. 1997. Nitrogen and carbon isotope ratios in termites: an indicator of trophic habit along the gradient from wood-feeding to soil-feeding. *Ecol. Entomol.* 22(3):343-351.
- TONINI, Rita M. C. Wetler; REZENDE, C. Eduardo; GRAVITOL, A. Daudt. Degradação e Biorremediação de compostos de Petróleo por Bactérias: Revisão. Rio de Janeiro: Oecologia Australis, 2010.
- VAZ, Gabrielli de Oliveira. Produção de biosurfactante por *bacillus pumilus* usando farelo de trigo como substrato. Tese de conclusão de curso, Universidade de Passo undó, 2013
- YAKUBU, M.B. 2007. Biological approach to oil spills remediation in the soil. *African Journal of Biotechnology*, 6 (24): 2735-2739.

ZANETTI, Ronald; CARVALHO, Geraldo Andrade; SILVA, Alan Souza; SANTOS, Alexandre dos; GODOY, Mauricio Sekiguchi. *Manejo Integrado de Cupins*. Minas Gerais: 2009.

## ANEXOS

- **ANEXO 01:** Sequência obtida e resultado da identificação molecular de *Psychrobacillus psychrodurans* pelo banco de dados NCBI

### Amostra 5

GCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTC  
GGATCGTAAAACCTCTGTTGTGAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAAC TGCTCGTACCTTGACGGTACCTCATT  
AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTG  
GGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAAGGTCATTG  
GAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAAGAGGAAAGCGGAATTC CAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTG  
GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTG GGGGAGCAAA  
CAGGATTAGATAC

Resultado pela busca em banco de dados NCBI: *Psychrobacillus psychrodurans*

- **ANEXO 02:**

Tabela 14: Valores obtidos no teste de Atividade Emulsificante

<b>SOLVENTE HEXANO E SOBRENADANTE</b>		
<b>Frasco 1/1</b>	<b>Frasco 1/2</b>	<b>Frasco 1/3</b>
Ht = 6	Ht = 5,9	Ht = 5,9
He = 2,8	He = 2,6	He = 2,8
E % = 46,6	E% = 44	E% = 47,4
<b>Frasco 2/1</b>	<b>Frasco 2/2</b>	<b>Frasco 2/3</b>
Ht = 6	Ht = 5,9	Ht = 5,8
He = 1,1	He = 0,8	He = 0,8
E% = 18,3	E% = 13,5	E% = 13,7
<b>Frasco 3/1</b>	<b>Frasco 3/2</b>	<b>Frasco 3/3</b>
Ht = 6,2	Ht = 6	Ht = 5,9
He = 2,2	He = 1	He = 1,9
E% = 35,4	E% = 16,6	E% = 32,2
<b>SOLVENTE XILENO E SOBRENADANTE</b>		
<b>Frasco 1/1</b>	<b>Frasco 1/2</b>	<b>Frasco 1/3</b>
Ht = 5,8	Ht = 5,8	Ht = 5,7
He = 3,1	He = 3,2	He = 3
E% = 53,4	E% = 55,1	E% = 52,6
<b>Frasco 2/1</b>	<b>Frasco 2/2</b>	<b>Frasco 2/3</b>

Ht = 6	Ht = 6	Ht = 6
He = 2,1	He = 1,7	He = 2,3
E% = 35	E% = 28,3	E% = 38,3
<b>Frasco 3/1</b>	<b>Frasco 3/2</b>	<b>Frasco 3/3</b>
Ht = 6	Ht = 5,9	Ht = 5,9
He = 2,3	He = 2,5	He = 2,4
E% = 38,3	E% = 42,3	E% = 40,6
<b>PETRÓLEO E SOBRENADANTE</b>		
<b>Frasco 1/1</b>	<b>Frasco 1/2</b>	<b>Frasco 1/3</b>
Ht = 4,9	Ht = 4,9	Ht = 5
He = 0,5	He = 0,3	He = 0,4
E% = 10,2	E% = 6,1	E% = 8
<b>Frasco 2/1</b>	<b>Frasco 2/2</b>	<b>Frasco 2/3</b>
Ht = 4,9	Ht = 4,9	Ht = 4,6
He = 0	He = 0	He = 0
E% = 0	E% = 0	E% = 0
<b>Frasco 3/1</b>	<b>Frasco 3/2</b>	<b>Frasco 3/3</b>
Ht = 5	Ht = 4,7	Ht = 4,9
He = 0	He = 0,6	He = 0
E% = 0	E% = 12,7	E% = 0

- **ANEXO 03:**

Tabela 15: Atividade Emulsificante utilizando o teste de Tukey

	A	B	C
A		0,5047	0,0006725
B	1,6		0,0001601
C	6,201	7,801	

- **ANEXO 04:**

Tabela 16: Hidrofobicidade Celular utilizando o teste de Tukey

	A	B	C
A		0,0001297	0,0831
B	9,639		0,0001291
C	3,182	12,82	

- ANEXO 05:

Tabela 17: Teste de Tukey em valores de Redução da Tensão Superficial

	A	B	C
A		0,0002269	0,0002269
B	44,39		0,0002549
C	27,8	16,6	

- ANEXO 06:

Tabela 18: Valores de Tensão Superficial obtida nos tempos 1, 7 e 12 dias de cultivo de *Psychrobacillus psychrodurans*

Controle Água	Tensão superficial 72 mN/m		
Experimental 01: Sobrenadante <i>Psychrobacillus psychrodurans</i> <b>Tempo: 1 dia</b>	69,3 mN/m	69,8 mN/m	70,1 mN/m
Experimental 02: Sobrenadante <i>Psychrobacillus psychrodurans</i> <b>Tempo: 7 dias</b>	54,2 mN/m	55,7 mN/m	54,1 mN/m
Experimental 03: Sobrenadante <i>Psychrobacillus psychrodurans</i> <b>Tempo: 12 dias</b>	60,1 mN/m	60,2 mN/m	60,6 mN/m

- **ANEXO 07:**

Tabela 19: Tabela com os valores obtidos dos halos em disco Antibiograma Gram Negativo de *Psychrobacillus psychrodurans*

Gram –	
Antibióticos	Diâmetro dos halos em milímetros
Amc 30	41
Cip 5	28
Crx 30	41
Cfl 30	42
Sut 25	42
Amp 10	4
Cfo 30	4
Gen 10	33
Aml 30	34
Mer 10	32
Caz 30	17
Cpm 30	29