

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELA CRISTINA ALVES DA SILVA

ANÁLISE DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE
BLENDAS DE DIESEL

PALOTINA

2023

GABRIELA CRISTINA ALVES DA SILVA

ANÁLISE DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE
BLENDAS DE DIESEL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Fiorini Rosado

PALOTINA

2023

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.
Biblioteca UFPR Palotina.

S586 Silva, Gabriela Cristina Alves da
Análise do potencial biotecnológico de bactérias isoladas
de blendas de diesel / Gabriela Cristina Alves da Silva.
– Palotina, PR, 2023.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Fiorini Rosado.

1. *Bacillus spp.* 2. Blendas de biodiesel. 3. Enzimas bacterianas.
I. Rosado, Adriana Fiorini. II. Universidade Federal do Paraná.
III. Título.

CDU 620

Bibliotecária: Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA -
40001016083P6

ATA Nº63

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRA EM BIOTECNOLOGIA

No dia quinze de setembro de dois mil e vinte e três às 15:30 horas, na sala 20 - Bloco Didático IV, UFPR - Setor Palotina, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestrand **GABRIELA CRISTINA ALVES DA SILVA**, intitulada: **Análise do potencial biotecnológico de bactérias isoladas de blendas de diesel**, sob orientação da Profa. Dra. ADRIANA FIORINI ROSADO. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: ADRIANA FIORINI ROSADO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), ELIANE HERMES (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), FÁBIO ROGÉRIO ROSADO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestra está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, ADRIANA FIORINI ROSADO, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

PALOTINA, 15 de Setembro de 2023.

Assinatura Eletrônica
22/09/2023 06:01:46.0
ADRIANA FIORINI ROSADO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
26/09/2023 08:48:13.0
ELIANE HERMES
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
23/09/2023 00:16:01.0
FÁBIO ROGÉRIO ROSADO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA
40001016083P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **GABRIELA CRISTINA ALVES DA SILVA** intitulada: **Análise do potencial biotecnológico de bactérias isoladas de blendas de diesel**, sob orientação da Profa. Dra. ADRIANA FIORINI ROSADO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 15 de Setembro de 2023.

Assinatura Eletrônica

22/09/2023 06:01:46.0

ADRIANA FIORINI ROSADO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

26/09/2023 08:48:13.0

ELIANE HERMES

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

23/09/2023 00:16:01.0

FÁBIO ROGÉRIO ROSADO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

RUA PIONEIRO, 2153 - PALOTINA - Paraná - Brasil

CEP 85950-000 - Tel: (44) 3211-8500 - E-mail: posbiotecnologia@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 317183

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 317183

AGRADECIMENTOS

Começo este agradecendo primeiramente a Deus e a minha mãezinha Nossa Senhora de Aparecida por me permitir finalizar este sonho, por todo o discernimento, fé, coragem e principalmente força para não desanimar ao longo desta jornada que não foi nada fácil.

Agradeço a Universidade Federal do Paraná-Setor Palotina, seu corpo docente, direção, administração, e aos servidores terceirizados, por sempre oferecer toda ajuda e um ambiente agradável, deixo aqui a minha total admiração e agradecimento a toda equipe que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, principalmente a Prof^a Dr^a Raquel Ströher e ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos técnicos responsáveis do Bloco de Química e ao pessoal do Labmater pela ajuda com materiais e reagentes no decorrer do projeto de pesquisa.

Em especial a técnica Jessica Gallego do laboratório de Microbiologia do Bloco Multidisciplinar por toda compreensão e ajuda durante essa jornada de experimentos.

Agradecer a Prof^a Dr^a Adriana Fiorini Rosado por ser essa professora e pessoa incrível a qual eu tenho orgulho em chamar de “Mãe da ciência” e pude ter o privilégio de ter como orientadora novamente e quem sabe em um futuro possa voltar a ser minha orientadora. Meu muito obrigada por cada ensinamento, cada hora no laboratório, cada risada e apoio quando o caminho parecia ainda mais difícil, para onde quer que o futuro me leve sempre poderá contar comigo e sempre me lembrarei com muito carinho dos anos compartilhados e da amizade que aqui cresceu.

A todo os professores que de uma forma ou outra esteve presente nesta jornada, alguns mais tempo, outros menos, mas de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui.

A Prof^a. Dr^a. Katherinne Maria Sperscoski pela ajuda e apoio prestados, principalmente nos últimos meses com os ajustes para que esse dia pudesse acontecer.

Ao Prof. Dr. Fabio Rogério Rosado e a Prof^a Dr^a Eliane Hermes por aceitarem a fazer parte da banca e por se disponibilizarem a avaliar esse trabalho.

Um agradecimento especial também a todo o nosso grupo de pesquisa do NEMA que se apoia e vibra pelos trabalhos e conquista de cada um dos seus

membros. Em especial a Juliet e a Hellen que me ajudaram com processos no laboratório nesta reta final, também pelas conversas e desabafos quando os resultados se tornavam frustrantes e alegrias quando os mesmos chegavam ao que esperávamos. Meninas contem sempre comigo para o que precisarem.

Agradeço imensamente aos meus pais Nelson e Tereza, por todo apoio durante essa caminhada, por me derem forças quando mais precisei e não me deixarem desanimar me lembrando sempre de olhar para o futuro e para onde eu queria chegar e olha só como as coisas acontecem nos momentos corretos, hoje a oportunidade tão sonhada chegou e vocês mais uma vez não mediram esforços em me ajudar, muito obrigada. Ao meu irmão Lucas, que mesmo com a própria jornada acadêmica sempre esteve ao meu lado. Aos meus avós Fernando e Iracema por cada oração e preocupação, vocês também foram fundamentais nesse processo de alçar a linha de chegada. A minha avó Darci que a sua maneira também me apoiou. Aos anjos que tenho céu que hoje não se fazem mais presentes aqui, mas que acredito que onde quer que estejam, neste momento estão felizes pela jornada que eu percorri e o objetivo concluído; podem não estar mais presentes fisicamente, mas sempre estiveram presentes no meu coração. Família parte desta conquista é de vocês, eu amo muitos todos vocês.

Agradeço também aos meus amigos Paulo, João, Lais, Juliana, Maria, Alexandre, Stefanny que se fizeram presentes durante essa caminhada, e que sempre entenderam que muitas vezes minha ausência era para que esse dia chegasse.

Um agradecimento especial a minha amiga irmã Luana, que mesmo estando longe nunca me deixou desistir, sempre me fez acreditar que eu venceria mais essa etapa e que hoje vibra pela minha conquista. Obrigada “miguinha” por tudo e amo você.

Um agradecimento especial a mim mesma (do passado) por não ter desanimado quando tudo parecia dar errado, pelas noites em claro, jornada longas de laboratório, fins de semana dedicados a pesquisa e tantas outras coisas deixadas de lado pensando apenas no Mestrado e com isto este dia só se torna possível graças a minha própria persistência, força e objetivos. Costumo dizer que algumas coisas precisam acontecer no momento em que aconteceram para que possamos aprender tudo o que a oportunidade nos tem a oferecer. Até porque o passado não volta, o futuro ainda não sabemos e o mais importante o hoje não acabou.

RESUMO

Devido à sua característica sustentável, o biodiesel pode ser considerado uma fonte de prospecção de microrganismos degradadores de substâncias orgânicas, com potencial para uso em processos biotecnológicos. Diversos trabalhos na literatura científica relatam o uso de microrganismos para a produção de biodiesel. No entanto, até onde sabemos, não foram encontrados artigos sobre a prospecção de microrganismos isolados dessas fontes. Os objetivos desse trabalho foram verificar o potencial amilolítico, lipolítico, celulolítico e proteolítico das bactérias isoladas de amostras de diesel e biodiesel; realizar a identificação, o antibiograma e verificar as propriedades antagonista das bactérias frente a fungos filamentosos. As bactérias *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. kochii*, *B. subtilis* e *B. thuringiensis* foram isoladas de amostras de óleo diesel com diferentes teores de biodiesel, enxofre e água e *Solibacillus* sp. e *Exiguobacterium acetylicum*, foram obtidas de diesel. Os isolados foram caracterizados por coloração de Gram e por sequenciamento da região do rDNA 16s. A análise da atividade degradadora substâncias orgânicas foi realizada através da verificação do halo de degradação de substratos em meios de cultivo específicos. O perfil de suscetibilidade a antibióticos e a capacidade hemolítica foi realizada, além da verificação da atividade antagonista das bactérias frente os fungos *Curvularia lunata*, *Fusarium* sp e *Drechslera* sp. Todos os isolados apresentaram alguma atividade degradadora. *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens* e *B. kochii* apresentaram maior atividade amilolítica. As bactérias *Solibacillus* sp. e *Exiguobacterium acetylicum*, isoladas de diesel S10, não apresentaram atividade amilolítica. Para o teste da atividade celulolítica, todas as bactérias isoladas de blendas de diesel apresentaram atividade, exceto *Solibacillus* sp. e *Exiguobacterium acetylicum*, isoladas do diesel, que não apresentaram crescimento. Para a análise da atividade de lipases foram verificadas a atividade de lipase (azeite e Tween-80) e esterases (Tween-20). Foi verificado que *B. kochii* e *B. thuringiensis* apresentaram maior capacidade de degradação do azeite. Em Tween-80, no período de 48 h, apenas *B. amyloliquefaciens* apresentou atividade. Após o período de 5 dias foram observados halos de degradação para os demais isolados, sendo mais pronunciado para *B. licheniformis*, *B. kochii*, *B. subtilis*, e *B. thuringiensis* e *Exiguobacterium acetylicum*. A atividade proteolítica foi observada para todos os isolados, sendo mais pronunciada para *B. subtilis*, *B. thuringiensis* e *E. acetylicum*. Todos os isolados apresentaram sensibilidade aos antibióticos testados, exceto à oxacilina. *B. licheniformis* foi a bactéria que apresentou maior resistência antimicrobiana. O antagonismo indicou que todas os isolados de *Bacillus* spp. foram capazes de reduzir o crescimento das colônias dos fungos *Fusarium* sp., *Curvularia lunata* e *Drechslera* sp., próximo à área de inóculo bacteriano. As bactérias isoladas de diesel, *E. acetylicum* e *Solibacillus* sp. não apresentaram ação antagonista. Esses resultados reforçam o potencial biotecnológico de degradação de substâncias orgânicas, baixo perfil de resistência microbiana e potencial para uso em controle de fitopatógenos, das bactérias, principalmente do gênero *Bacillus*, isoladas de blendas de biodiesel.

Palavras-chave: *Bacillus* spp., blendas de biodiesel, enzimas bacterianas.

ABSTRACT

Several works have reported the use of microorganisms for the biodiesel production. However, to the best of our knowledge, no works were found on the prospecting of microorganisms isolated from these sources. The objectives of this work were to verify the amylolytic, lipolytic, cellulolytic and proteolytic potential of bacteria isolated from diesel and biodiesel samples; perform the bacteria identification, antibiogram profile and analysis the antagonistic properties of bacteria against filamentous fungi. *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. kochii*, *B. subtilis* and *B. thuringiensis* were isolated from diesel oil with different contents of biodiesel, sulfur and water and *Solibacillus* sp. and *Exiguobacterium acetylicum*, were obtained from diesel. The isolates were characterized by Gram staining and sequencing of the 16s rDNA region. The analysis of the degrading activity of organic substances was carried out by verifying the degradation halo of substrates in specific cultivation media. It was also investigated the antibiotic susceptibility profile, the hemolytic activity and antagonistic activity of bacteria against the fungi *Curvularia lunata*, *Fusarium* sp and *Drechslera* sp. All isolates showed degrading activity. *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens* and *B. kochii* showed higher amylolytic activity. *Solibacillus* sp. and *Exiguobacterium acetylicum*, isolated from diesel S10, did not show amylolytic activity. For the cellulolytic activity test, all bacteria isolated from diesel blends showed activity, except *Solibacillus* sp. and *Exiguobacterium acetylicum*, isolated from diesel, which did not show growth. For the analysis of lipase activity, lipase activity (olive oil and Tween-80) and esterases (Tween-20) were verified. It was found that *B. kochii* and *B. thuringiensis* had a high capacity for olive oil degradation. In Tween-80, within 48 h, only *B. amyloliquefaciens* showed activity. After a period of 5 days, degradation halos were observed for the other isolates, being more pronounced for *B. licheniformis*, *B. kochii*, *B. subtilis*, and *B. thuringiensis* and *Exiguobacterium acetylicum*. Proteolytic activity was observed for all isolates, being more pronounced for *B. subtilis*, *B. thuringiensis* and *E. acetylicum*. All isolates were sensitive to the antibiotics tested, except for oxacillin. *B. licheniformis* was the bacteria that showed the greatest antimicrobial resistance. Antagonism indicated that all *Bacillus* spp. were able to reduce the growth of colonies of the fungi *Fusarium* sp., *Curvularia lunata* and *Drechslera* sp., in the proximities of the bacterial inoculum area. The bacteria isolated from diesel, *E. acetylicum* and *Solibacillus* sp. did not present antagonistic action. These results reinforce the biotechnological potential for degradation of organic substances, low microbial resistance profile and potential for use in controlling phytopathogens, of bacteria, mainly of the *Bacillus* genus, isolated from biodiesel blends.

Keywords: *Bacillus* spp., biodiesel mixtures, bacterial enzymes.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESBOÇO DAS ETAPAS APLICADAS NA EXECUÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	24
FIGURA 2. TESTE DO POTENCIAL AMIOLÍTICOS DOS ISOLADOS POR INÓCULO EM PERFURAÇÃO DO ÁGAR AMIDO.....	31
FIGURA 3. TESTE DO POTENCIAL CELULOLÍTICO DOS ISOLADOS POR INÓCULO EM PERFURAÇÃO DO ÁGAR CMC.....	32
FIGURA 4. TESTE DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA POR PERFURAÇÃO EM ÁGAR AZEITE COM INDICADOR VERMELHO DE FENOL.....	33
FIGURA 5. TESTE DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA APÓS 48 HORAS E APÓS 120 HORAS POR PERFURAÇÃO EM ÁGAR COM TWEEN 80.....	34
FIGURA 6. TESTE DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA APÓS 48 HORAS E APÓS 120 HORAS POR PERFURAÇÃO EM ÁGAR COM TWEEN 20.....	36
FIGURA 7. HALO DE HIDRÓLISE DOS ISOLADOS COM MAIOR POTENCIAL PROTEOLÍTICO.....	37
FIGURA 8. ANÁLISE DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE ALGUNS DOS ISOLADOS EM ÁGAR SANGUE POR ESTRIA EM ESGOTAMENTO.....	38
FIGURA 9. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS.....	43
FIGURA 10. ATIVIDADE ANTAGONISTA DOS ISOLADOS SOB <i>Drechslera</i> sp.....	46
FIGURA 11. ATIVIDADE ANTAGONISTA DOS ISOLADOS SOB <i>Curvularia lunata</i>	47
FIGURA 12. ATIVIDADE ANTAGONISTA DOS ISOLADOS SOB <i>Fusarium</i> sp.....	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. BACTÉRIAS ISOLADAS DE ÓLEO DIESEL, MISTURAS E BIODIESEL.....	21
TABELA 2. COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DE COMBUSTÍVEL.....	25
TABELA 3. BACTÉRIAS ISOLADAS DAS AMOSTRAS DE COMBUSTÍVEL.....	30
TABELA 4. POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS.....	41
TABELA 5. PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS.....	44
TABELA 6. ANTAGONISMO BACTÉRIAS E FUNGOS.....	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 ENZIMAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS POR MICRORGANISMOS.....	15
2.1.1 Amilases.....	15
2.1.2 Celulases.....	16
2.1.3 Lipases.....	17
2.1.4 Proteases.....	17
2.2 COMBUSTÍVEIS E CONTAMINAÇÃO BACTERIANA.....	18
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA.....	24
4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS.....	24
4.2.1 Isolados bacterianos.....	24
4.2.2 Caracterização macroscópica e microscópica das bactérias.....	25
4.2.1 Caracterização molecular.....	26
4.3 TESTES DE ATIVIDADE DEGRADADORA.....	27
4.3.1 Atividade amilolítica.....	27
4.3.2 Atividade proteolítica.....	27
4.3.4 Atividade lipolítica.....	27
4.3.5 Atividade celulolítica.....	28
4.4 TESTE DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS ISOLADOS.....	28
4.5 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTAGONISTA.....	29
4.6 ANTIBIOGRAMA.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 BACTÉRIAS IDENTIFICADAS.....	30
5.2 POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS E ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	31
5.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA.....	42
5.4 ANTAGONISMO DAS BACTÉRIAS CONTRA FUNGOS FILAMENTOSOS.....	45
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos podem ser encontrados em diversos *habitats*, mesmo em condições extremas, desempenham um papel crucial no funcionamento dos ecossistemas vivos. Tecnologias tradicionais e avançadas de bioprospecção de microrganismos têm sido desenvolvidas e empregadas a fim de aumentar o conhecimento sobre a diversidade microbiana de processos funcionais em ecossistemas microbianos, e para a identificação e utilização de novos produtos biotecnológicos (SHINTANI et al., 2021).

Dentre os diferentes *habitats*, os microrganismos podem ser encontrados em tanques de armazenamento de diesel e biodiesel, sendo normalmente associados com a degradação desses combustíveis. A prevenção do crescimento de microrganismos nesses locais é uma grande preocupação para os setores industriais e/ou comerciais devido aos problemas associados que são causados pela corrosão, entupimento de filtros e bloqueio em armazenamento, linhas de combustível e/ou instalações de distribuição (KOMARIAH et al., 2022). A degradação microbiana pode ocorrer em qualquer parte da cadeia de produção, seja na produção, transporte até o uso do combustível.

Como o biodiesel apresenta uma alta capacidade de higroscopicidade, e com o acúmulo de umidade no interior dos tanques de armazenamento, sua capacidade de absorção de água é alta (FATTAH et al., 2014; BEKER et al., 2016; NEVES et al., 2020), sendo a água um dos principais fatores que favorecem a contaminação microbiana (PASSMAN, 2013; BENTO et al., 2016; CAZAROLLI, 2019; NEVES et al., 2020; POLINARSKI et al., 2022).

Os biocombustíveis têm sido considerados combustíveis substitutos devido à sua renovabilidade, métodos de produção seguros, não toxicidade, baixa emissão de gases tóxicos, comparando com os combustíveis fósseis (GONG et al., 2022). Dessa forma, devido à sua característica sustentável, o biodiesel pode ser considerado uma fonte de prospecção de microrganismos degradadores de substâncias orgânicas, com potencial para uso em processos biotecnológicos.

Diversos trabalhos na literatura científica relatam o uso de microrganismos para a produção de biodiesel (ZHANG et al., 2021). No entanto, até onde se sabe não há estudos sobre a prospecção de microrganismos isolados dessas fontes.

Muitas espécies de microrganismos têm sido encontradas em combustíveis, embora nem todas sejam capazes de metabolizar hidrocarbonetos. Exemplos de bactérias capazes de usar hidrocarbonetos como fonte de carbono estão entre os gêneros *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas* e *Vibrio* (KOMARIAH et al., 2022; BASTIAENS et al., 2000; BOONCHAN et al., 2000).

Metabólitos microbianos são responsáveis pelas inúmeras interações entre o ambiente e os próprios microrganismos com o recrutamento da dinâmica de ecossistemas específicos (JUNKINS et al., 2022). Os microrganismos também são recursos biológicos valiosos para a geração de biomateriais e para a degradação de matéria orgânica (HUANG et al., 2022). Enzimas produzidas por microrganismos são grandes alvos em processos biotecnológicos, devido à facilidade de cultivo, vasto conhecimento da fisiologia, genética e propriedades bioquímicas dos microrganismos.

As espécies bacterianas degradadoras de combustíveis podem possuir diversas enzimas produzidas para catalisar a degradação de vários substratos específicos. Os microrganismos, em especial as bactérias, produzem diversas enzimas conhecidas como enzimas hidrolíticas tais como as proteases, lipases, amilases ou as celulases. Enzimas hidrolíticas tem como função a degradação de várias substâncias naturais. O gênero *Bacillus* é comumente encontrado em diesel e biodiesel e inclui tanto bactérias patogênicas como benéficas. Espécies de *Bacillus* não patogênicas têm sido implicadas em diversas aplicações industriais como a produção industrial de enzimas com grande interesse nos setores de detergentes e alimentos; produção de metabólitos primários como vitaminas e ribonucleosídeos; metabólitos secundários, incluindo bacteriocinas e biossurfactantes, e formulações que promovem o crescimento de plantas (RADDADI et al., 2012).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ENZIMAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS POR MICRORGANISMOS

2.1.1 Amilases

O amido é utilizado na indústria como matéria prima, principalmente no ramo alimentício, podendo ser utilizado na forma hidrolisada, e na produção de tecido, papel e embalagens. O principal produto da hidrólise do amido é a glicose, que pode ser convertida em diversos outros produtos, como o etanol (BAWA et al., 2010).

A hidrólise do amido pode ocorrer por hidrólise ácida, entretanto o uso de enzimas tem substituído os produtos químicos durante a produção dos produtos à base de glicose. As amilases produzidas por plantas, animais e microrganismos apresentam uma ampla gama de aplicações industriais (TORNEY et al., 2007; SUN et al., 2010).

A amilase é uma das mais importantes enzimas utilizadas no campo da biotecnologia. As de amilases de origem microbiana tem alcançado muitas áreas devido ao seu amplo uso nas indústrias de alimentos, panificação, detergentes e têxteis (VERMA et al., 2012). Estas enzimas são importantes devido às suas aplicações comerciais em liquefação de amido, papel, acabamento de tecidos, remoção de papel de parede, indústria cervejeira, produção de xaropes de açúcar etc. (HMIDET et al., 2019).

Dentre os microrganismos produtores de enzimas estão as bactérias, que não dependem de outro ser para seu crescimento, podem utilizar substratos de baixo custo e podem ser produzidas em larga escala. A maioria das amilases utilizadas na indústria são de origem microbiana devido a vários fatores, por exemplo, a grande diversidade genética microbiana presente no ambiente, alta atividade enzimática em uma ampla gama de condições (pH extremo, temperatura, osmolaridade, pressão etc.), e produção simples e econômica (BURHAN et al., 2003). As enzimas produzidas por microrganismos também são mais ativas e estáveis que as de plantas e animais.

Vários microrganismos são capazes de produzir amilases, incluindo *Bacillus* spp., *Lactobacillus*, *Pseudomonas* spp., *Proteus*, *Escherichia* e *Streptomyces* spp. Entre as diversas enzimas amilolíticas, a que mais se destaca é a α -amilase, que

apresenta a capacidade de degradar o amido em maltose, glicose e dextrina, além de ser induzida na presença de maltose ou amido (GUPTA et al., 2003).

2.1.2 Celulases

O termo “celulase” refere-se a todas as enzimas, sistemas e estruturas celulolíticas, incluindo celulases produzidas intracelularmente ou liberadas ao ambiente extracelular, por microrganismos. Tendo em vista que a celulase é um polímero de alta resistência e difícil degradação, as enzimas celulolíticas tem a função de clivar as ligações glicosídicas β -1,4 presentes na celulose (BEHERA et al., 2014). Com isso diferentes celulases podem exibir variados mecanismos de ação de acordo com a região em quem hidrolisam a celulose (KORSA et al., 2022). Algumas das celulase já descritas são: endoglucanase (EC 3.2.1.4), Exoglucanase (EC 3.2.1.91): 1,4- β -D-glucano e celobiohidrolases (I e II) e β -Glucosidase (EC 3.2.1.21) (LINTON, 2020).

O setor de maior destaque para esta enzima é na indústria têxtil, no processamento do algodão e linho, onde auxilia o processo de lavagem, amaciamento e recuperação da cor. Industrias de processamento de alimentos também se beneficiam das celulases reduzindo as fibras presentes em grão de forma a elevar a drenagem nos processos (PRAKASH et al., 2013).

Pensando na clivagem hidrolítica da celulose que resulta em formação de açúcares que fermentados produz álcool, as indústrias de biocombustíveis também têm se tornado um grande mercado para as celulases (WILSON, 2009; REYAD, 2013).

Microalgas, bactérias e fungos são os microrganismos que mais produzem celulases extracelulares. Devido à sua ampla diversidade bioquímica, à capacidade de gerar culturas em massa e à facilidade de realização de modificações genéticas, as enzimas liberadas por esses microrganismos são adequadas para síntese em larga escala (IRAM et al., 2022; DANSO et al., 2022).

Os gêneros *Aeromonas*, *Bacillus* e *Exiguobacterium* são grandes representantes das bactérias produtoras de celulases (CHANTARASIRI, 2021).

2.1.3 Lipases

As lipases microbianas (EC 3.1.1.3) catalisam a hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa. As lipases de origem microbianas são dinâmicas e proficientes e possuem uma extensa gama de aplicações industriais (CHANDRA et al., 2020). Os triglicerídeos são hidrolisados em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol através da ação das lipases. As ligações ésteres carboxílicas podem ser hidrolisadas por esterases, além de lipases (ALMEIDA et al., 2019).

Recentemente, pesquisadores da área da biotecnologia microbiana tem aumentado o interesse no uso comercial de lipases de origem microbiana, e uma vasta gama de microrganismos tem sido caracterizados como produtores de lipases (ALI et al., 2023). Bactérias como *Pseudomonas alcaligenes*, *P. aeruginosa*, *P. fragi*, *P. fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *B. nealsonii*, *Bacillus megaterium* e *Aeromonas hydrophila* e algumas espécies de fungos como *Penicillium expansum*, *Trichoderma sp.*, *Penicillium chrysogenum* e *Aspergillus niger* são considerados grandes produtores de lipases (PHULPOTO et al., 2020, HASELROTH et al., 2021). Dentre esses microrganismos, o gênero *Bacillus* tem grande destaque na produção de lipases (MATHEW e IZOMOR, 2023, ANDERLE, 2021).

As lipases são comumente utilizadas na indústria alimentícia e desempenham um papel eficaz na fabricação de uma variedade de produtos alimentícios (alimentos assados, sucos e alimentos fermentados). São também são amplamente utilizadas nas indústrias de limpeza, processamento de couro, cosméticos, papel e detergentes, além de outras aplicações, como uso em biossensores, produção de biodiesel, aplicações biomédicas, pesticidas e biorremediação (PHULPOTO et al., 2020).

2.1.4 Proteases

As proteases tem como função hidrolisar as ligações peptídicas em proteínas, de forma a liberar aminoácidos e peptídeos. São classificadas de acordo com os subprodutos liberados na hidrolise, sendo usualmente segregadas em dois grupos: as exopeptidases que são capazes de produzir pequenos peptídeos ou aminoácidos através das extremidades amino-terminal (N) e/ou carboxi-terminal (C); já as endopeptidases, são capazes de produzir peptídeos maiores através da hidrolise da proteína alvo longe do amino e/ou carboxi-terminais (BARBOSA, 2011)

Comercialmente, as proteases são de extrema importância, pois se encontram em diversas aplicações como nos detergentes, couro, na panificação, na fabricação de cerveja, na síntese de peptídeos, na indústria farmacêutica, no hidrolisado de proteína, cosméticos, além do tratamento de resíduos, apresentando um alto valor comercial e cerca de 60% das vendas de enzima mundialmente (GODFREY e WEST, 1996, SUMANTHA et al., 2006).

Com a alta demanda e visando a viabilidade, agilidade de produção e baixo custo, proteases microbianas tem ganhado destaque em relação as obtidas por animais e vegetais (ELLAIAH et al., 2002, DANILOVA e SHARIPOVA, 2020, SHARMA et al., 2017). Microrganismos oferece uma melhor fonte de proteases do que plantas, pois pode ser cultivado em grandes quantidades em um curto período, sendo relativamente barato e podem fornecer um contínuo produto desejado (SHARMA et al., 2019). Além disso, as bactérias proteolíticas podem ser geneticamente modificadas para gerar linhagens de alto rendimento com a produção de enzimas proteases ainda mais eficientes e com propriedades específicas para atender uma demanda desejada (FACCHIN, 2013).

Vários estudos vêm sendo feitos com diversos gêneros de bactérias e fungos diferentes verificando o seu potencial proteolítico biotecnológico. Cepas de fungos como *Aspergillus* spp., *Chyso sporium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Scedosporium* spp., e bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e em especial *Bacillus* que mais possui relatos na produção de proteases ganhando importância em escala industrial, com destaque para as espécies *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* e *B.* (PRAKASHAM et al., 2006).

2.2 COMBUSTÍVEIS E CONTAMINAÇÃO BACTERIANA

A utilização de hidrocarbonetos por microrganismos como fonte de carbono é uma característica presente em muitos, no entanto, aqueles que não possuem essa capacidade utilizam ésteres graxos do biodiesel e metabólitos secundários de outros microrganismos como alternativa. Além disso, os aditivos presentes no óleo diesel, como compostos fosforados e nitrogenados, podem servir como fonte de nutrientes para diversos microrganismos (HILL e HILL, 2009; JAKERIA et al., 2014; NEVES, 2023).

Estudos realizados por Hill e Hill (2009) e Jakeria et al. (2014) ressaltam que além dos hidrocarbonetos, os microrganismos também necessitam de nutrientes inorgânicos para seu desenvolvimento. Esses nutrientes podem ser provenientes de resíduos químicos presentes no ambiente ou da água presente no combustível.

Além dos nutrientes necessários para o crescimento, algumas condições também são essenciais para favorecer a proliferação dos microrganismos como água, temperatura e pH. A presença de água é fundamental, já que os microrganismos utilizam a para realizar suas atividades metabólicas. No entanto, a água pode contribuir para a formação da borra ao iniciar o processo de oxidação do combustível que inicia principalmente durante o período de estocagem, alterando as propriedades físico-químicas. É neste processo de degradação que materiais particulados começam a se formar e sedimentar no fundo dos tanques (PULLEN e SAEED, 2012; BENTO et al., 2016; NEVES, 2023).

A temperatura também atua em um papel importante, porém os microrganismos apresentam uma ampla faixa de temperatura para crescimento (4 a 60°C), o que não o torna um fator totalmente determinante já que temperaturas entre 20 e 30°C abrangem a maioria dos microrganismos (CHUNG et al., 2000; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2010; NEVES et al., 2020).

O pH para uma boa proliferação precisa estar adequado, pois a maioria dos microrganismos possuem uma faixa de pH entre 6,5 e 7,5 como ótimo, logo, a variação implica de modo direto no seu crescimento. Contudo, os microrganismos têm uma alta sobrevivência e podem até se proliferar em condições variáveis entre 4 e 9, onde as condições mais neutras favorecem diretamente as bactérias e o meio ácido contribuem para o crescimento fúngico. O pH no tanque pode influenciar totalmente na quantidade de água presente, pois ao apresentar melhores condições de crescimento se torna cada vez mais um ambiente ideal de proliferação (CHUNG et al., 2000; BENTO et al., 2005; ZIMMER et al., 2013; BUCKER et al., 2014).

De acordo com a Resolução nº16 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), passa a entrar em vigor a partir de 1º de abril de 2023 que a mistura de biodiesel no diesel passa de 10% para 12% e a estimativa é de que a partir de 2026 essa mistura chegue a 20%. A mistura de biodiesel em óleo diesel é possível devido a sua miscibilidade, com isso a Lei nº 13.263 de 23/03/2016 estabelece valores de até 15% de mistura aprovada até 2023. Essa combinação passou a se iniciar no Brasil

em 2008, já que a utilização do biodiesel promove vantagens e benefícios ambientais (MEIRA et al., 2016; NEVES, 2018).

O biodiesel presente no óleo diesel apresenta características diferentes que estão diretamente relacionados ao seu processo de produção, mais diretamente a matéria-prima utilizada, que pode promover diferentes sedimentos químicos que podem ser utilizados pelos microrganismos como fonte de nutrientes. As características higroscópicas, degradabilidade e solvência, proporciona uma maior facilidade no processo de proliferação de microrganismos (HILL e HILL, 2009; JAKERIA et al., 2014; NEVES, 2018).

Estudos realizados em âmbito nacional e internacional, evidencia que a adição do biodiesel ao óleo diesel acarreta uma maior produção de biomassa e sedimentos biológicos, principalmente em contato com água nos tanques de armazenamento e transporte (BENTO et al., 2006; DODOS et al., 2011; RESTREPO-FLOREZ et al., 2013; ZIMMER et al., 2013; BUCKER et al., 2014; LISIECK et al., 2014).

Os microrganismos são encontrados tanto em biodiesel puro, quanto no óleo diesel fóssil e blendas (com adição de biodiesel), tais como: bactérias anaeróbias e aeróbias, fungos e leveduras (BENTO e GAYLARDE, 2001; BUCKER et al., 2011; PULLEN e SAEED, 2012; NEVES, 2018). A Tabela 1 apresenta informações da literatura das principais bactérias isoladas de amostras de combustível.

TABELA 1. BACTÉRIAS ISOLADAS DE ÓLEO DIESEL, MISTURAS E BIODIESEL.

Bactérias	Combustível	Referências
<i>Acetobacter peroxydans</i>	Diesel	Martin-Sanchez et al. (2016)
<i>Acinetobacter</i> sp.	Diesel	Bento et al. (2005); Onuorah et al. (2013); Azambuja et al. (2017); Neves et al. (2020)
<i>Actinobacteria</i> sp.	Diesel	White et al. (2011); Salgado et al. (2013)
<i>Aeromonas</i> sp.	Misturas	Bucker et al. (2014)
<i>Bacillus</i> sp.	Diesel e misturas	Bento e Gaylarde (2001); White et al. (2011); Onuorah et al. (2013); Salgado et al. (2013); Bucker et al. (2014); Azambuja et al. (2017); Cazarolli et al. (2018); Neves et al. (2020)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Biodiesel e misturas	Soriano et al. (2015)
<i>B. cereus</i>	Diesel	Bento e Gaylarde (2001); Bento et al. (2005); White et al. (2011)
<i>B. subtilis</i>	Diesel	Bento e Gaylarde (2001)
<i>Clostridium</i> sp.	Biodiesel e Misturas	White et al. (2011); Sørensen et al. (2011); Bucker et al. (2014); Neves et al. (2020)
<i>Enterobacter</i> sp.	Misturas	White et al. (2011); Neves et al. (2020)
<i>Enterococcus</i> sp.	Misturas	Neves et al. (2020)
<i>Klebsiella</i> sp.	Misturas	Chao et al. (2010); White et al. (2011); Bucker et al. (2014)
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Diesel	Martin-Sanchez et al. (2016)
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. paraplantarum</i>		
<i>L. casei</i>		
<i>L. zeae</i>		
<i>Pseudomonas</i> sp.	Diesel e misturas	Bento e Gaylarde (2001); White et al. (2011); Onuorah et al. (2013); Salgado et al. (2013); Bucher et al. (2014); Lisiecki et al. (2014)
<i>Rhodococcus</i> sp.	Diesel, biodiesel e mistura	Salgado et al. (2013); Bucker et al. (2014)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Diesel	Martin-Sanchez et al. (2016)
<i>Staphylococcus</i> sp.	Diesel	Chao et al. (2010); White et al. (2011); Neves et al. (2020)

FONTE: NEVES (2023)

Ao se deparar com essas contaminações microbiológicas é possível analisar os problemas em decorrência do contato com a água ou umidade em tanques que

podem afetar todo o processo de produção, transporte, armazenagem e uso do combustível, reduzindo a qualidade e desempenho do motor (NEVES, 2018).

Entretanto é possível encontrar também uma gama de microrganismos capazes de crescerem com uma única fonte de carbono e nutrientes reduzidos, sob condições não convencionais. Além de trazer inúmeros benefícios para fins biotecnológicos como obtenção de enzima e bioprodutos, além de vantagens ambientais. Já que os microrganismos crescem utilizando estes hidrocarbonetos como fonte de carbono porque não utilizar os mesmo para fins de biorremediação sem causar mais danos ao meio ambiente?

Vale ressaltar a importância de avaliar o microrganismo a ser utilizado para uma possível biorremediação ou produção de um bioproduto de interesse, pois alguns dos microrganismos isolados dessas fontes estão diretamente relacionados a infecções, doenças e intoxicações alimentares em humanos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

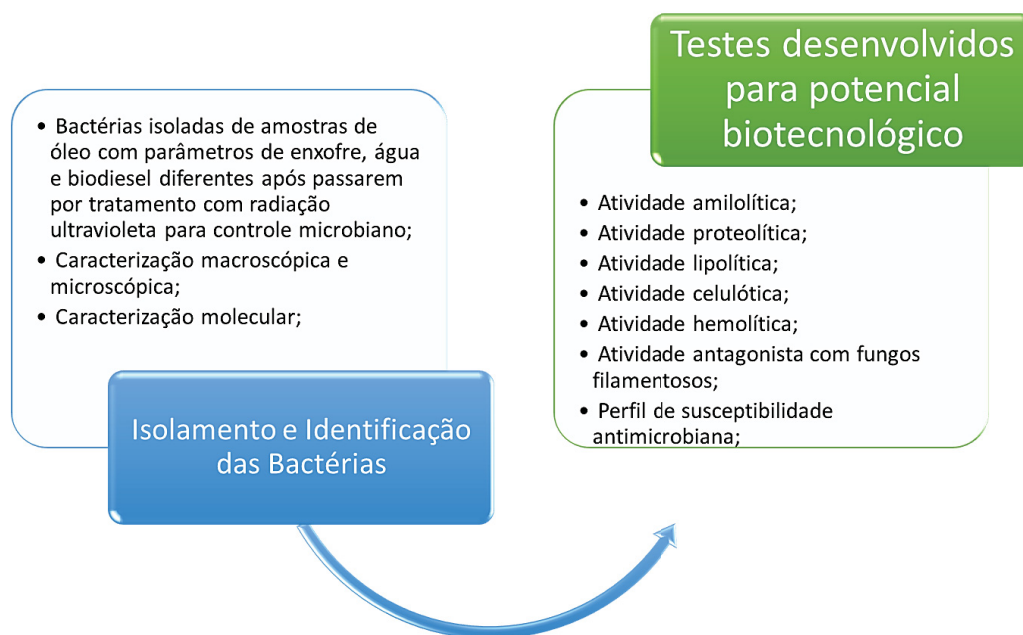
Potencial biotecnológico de bactérias isoladas de blendas de diesel.

3.2 Objetivos específicos

- Isolamento dos microrganismos presentes nas blendas de diesel testadas;
- Verificar o potencial amilolítico, lipolítico, celulolítico e proteolítico dos isolados;
- Realizar a identificação microbiológica e molecular dos isolados bacterianos;
- Verificar a atividade antagonista das bactérias frente a fungos filamentosos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

FIGURA 1. ESBOÇO DAS ETAPAS APLICADAS NA EXECUÇÃO DOS EXPERIMENTOS.



FONTE: O autor (2023)

4.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

Os experimentos foram realizados no Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA) e no Laboratório de Microbiologia, da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina.

4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

4.2.1 Isolados bacterianos

Um total de oito bactérias, isoladas de diesel e de blendas de biodiesel (diferentes teores de biodiesel, enxofre e água) foram previamente isoladas durante

projetos de pesquisa realizados em parceria com nossa equipe (POLINARSKI et al., 2022; NEVES, 2023). Os isolados estavam armazenados em freezer a -20°C , contendo meio LB (Luria-Bertani) e glicerol (15%). A tabela 2 apresenta uma descrição das fontes de combustíveis e suas misturas.

TABELA 2. COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DE COMBUSTÍVEL.

Amostra de combustível	Especificações		
	Biodiesel (%)	Teor de enxofre* (ppm)	Adição de água** (ppm)
B11-S10-NW	11	10	-
B20-S10-NW	20	10	
B20-S500-NW		500	
B11-S10-LW	11	10	2500
B11-S500-LW		500	
B20-S10-HW	20	10	10000
Óleo diesel S10	-	10	-

*Teor de enxofre de acordo como foi adquirido no posto de combustível, podendo atingir no máximo 10 ppm e 500 ppm respectivamente. **Adição de água nas amostras de combustível (NW: no water added; LW: low water – 2500 ppm; HW: high water – 10000 ppm). FONTE: Neves (2023)

4.2.2 Caracterização macroscópica e microscópica das bactérias

As bactérias armazenadas foram reativadas em 5 ml de caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas a 36°C por 24 h. Em seguida foram analisados os aspectos de morfologia de colônia e características morfotintoriais (Coloração de Gram), de acordo com o método descrito por Strohl et al. (2004).

4.2.3 Caracterização molecular

Os isolados foram previamente cultivados em 3 ml de caldo LB e mantidos em agitação a 120 rpm a 37°C por 16 h. O *pellet* celular foi obtido por centrifugação e a extração do DNA foi realizada de acordo com o método *in house*, descrito por Shahriar et al. (2011) com pequenas modificações. O DNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (ThermoScientific) e a integridade das amostras foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TBE 1x (Tris-base 90 mM; Ácido bórico 90 mM; EDTA 2 mM pH 8,0).

A amplificação da região 16S foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os *primers* Y1 *forward* (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3') (YOUNG et al., 1991) e Y3 *reverse* (5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC-3') (CRUZ, 2001) que produzem uma região de *amplicon* com cerca de 1500 pb. A amplificação foi realizada com o kit da Promega Corporation (GoTaq® DNA Polymerase) constituído de 50 ng de DNA genômico, tampão de PCR 1x contendo 1,5mM de MgCl₂, 0,8 mM do mix de dNTP, 1 unidade de *Taq* DNA Polimerase e 0,5 µM de cada *primer*, em um volume final de 25 µl. As condições de ciclagem foram: 2 min iniciais a 95 °C, e 30 ciclos de 1 min a 95 °C, de 1 min a 57 °C e de 1 min a 72 °C, como extensão final de 5 min a 72 °C. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE 1X utilizando padrão de peso molecular de 100 pb (Ludwig Biotecnologia) com 0,5 µg/ml de brometo de etídio e fotodocumentados em equipamento Locus Biotecnologia L.PIX.

Para o sequenciamento da região 16S, uma alíquota de 2 µL dos produtos de PCR foi quantificada com o auxílio do Nanodrop2000, onde o grau de pureza foi determinado pela relação A260/280. Após essa quantificação, 60 ng do produto de PCR juntamente com 0,45 pmol dos *primers forward* e *reverse* foram enviados para a empresa Ludwig Biotecnologia (Alvorada, RS), para a realização do sequenciamento, usando o equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os eletroferogramas foram analisados utilizando o software BioEdit Sequence Alignment Editor (1997-2013) e utilizando o BLASTn (versão 2.215 do BLAST 2.0) os resultados do sequenciamento foram comparados com as sequências depositadas nos bancos de dados.

4.3 TESTES DE ATIVIDADE DEGRADADORA

4.3.1 Atividade amilolítica

Foi realizada uma avaliação da atividade amilolítica das bactérias em placas de Petri contendo meio de cultura utilizando o amido (1%) como única fonte de carbono. O meio foi preparado com 10 g de amido (maizena), 0,4 g de NH_4Cl , 0,8 g de K_2HPO_4 , 0,12 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,12 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 20 g de ágar bacteriológico para 1000 ml de água destilada, conforme descrito por Lozada (2015), com algumas modificações. As bactérias foram inoculadas por picada central, com o auxílio de uma agulha microbiológica, em quadruplicata. As placas foram incubadas em estufa à 36°C por 48 h. Após a incubação, a presença de halos de hidrólise do amido foi analisada visualmente, após coloração com Lugol a 1% por 15 minutos e mantidas sobre a bancada por 24 h.

4.3.2 Atividade proteolítica

O potencial proteolítico dos isolados foi testado em placas de Petri contendo meio de cultura composto de: 5 g de peptona bacteriológica, 2,5 g de extrato de levedura, 1 g de glicose, 1 g de leite em pó, 10 g de ágar bacteriológico, para 1000 mL de água destilada, pH ajustado a 6,5 com ácido sulfúrico e/ou hidróxido de potássio (HUFF, 2019). As bactérias foram inoculadas por picada central, a partir de uma cultura recente. As placas foram incubadas em estufa à 36°C por 48 h e a presença de halos de crescimento translúcido ao redor da borda da colônia foram verificados.

4.3.3 Atividade lipolítica

A análise do potencial lipolítico das bactérias testadas foi realizada utilizando diferentes substratos como única fonte de carbono nos meios de cultura, para a verificação das atividades de lipases e esterases. No protocolo 1, descrito por Sierra (1957) com alterações, foi utilizado então 10 g de Peptona, 5 g de NaCl , 0,1 g CaCl_2 , 20 g de ágar bacteriológico, 1% de Tween-20 ou Tween-80 em 1000 mL de água destilada. O meio foi autoclavado e após resfriar à 50°C foi adicionado o substrato,

homogeneizado e vertido em placas de Petri. O Tween foi utilizado como única fonte de carbono, onde é possível ver a formação da precipitação dos sais de cálcio.

Para o protocolo 2, descrito por Ramnath et al. (2017), e utilizou-se de 0,01% de vermelho de fenol, 1 g de CaCl₂, 1% de óleo vegetal (azeite) e 20 g de ágar bacteriológico em 1000 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 7,3 - 7,4 com 0,1N NaOH, em seguida foi autoclavado a 121°C por 20 min e após atingir 50°C o substrato foi adicionado, homogeneizado e vertido. Neste protocolo o vermelho de fenol age como um indicador, onde quando a bactéria utiliza essa fonte de carbono uma alteração no pH do meio acontece resultando em uma alteração do amarelo alaranjado para vermelho.

Ambos os protocolos foram inoculados através de picada central com auxílio de uma agulha bacteriológica, incubadas a 36°C por 48 h para análise da formação de precipitado ou mudança de cor, mantidos em temperatura ambiente por mais 3 dias e então feito uma nova avaliação.

4.3.4 Atividade celulolítica

O meio de cultura para análise da atividade celulolítica (THIELE, 2021) continha 1,5 % de carboximetilcelulose (CMC), como única fonte de carbono, 0,2 g de NaNO₃, 0,1 g de KH₂PO₄, 0,05 g de MgSO₄, 0,05 g de KCl, 1,7 g de ágar para 100 mL de água destilada. Após a preparação o pH do meio encontra-se entre 5,2 e 5,9, uma vez estabilizado o pH, o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min. As placas contendo meio CMC foram inoculadas por picada central com uso de uma agulha bacteriológica e incubada à 36°C por 48h. Após esse crescimento, foi realizada a verificação do halo enzimático, por meio da coloração das placas com o corante Vermelho do Congo (2,5 mg/mL), interagindo por 30 min e posteriormente lavadas com a solução de NaCl 1 M (TEATHER e WOOD, 1982).

4.4 TESTE DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS ISOLADOS

A avaliação da atividade hemolítica foi realizada em ágar sangue (TSA com 5% de sangue de carneiro - Laborclin®), através de inóculo por estria de esgotamento com auxílio de uma alça bacteriológica com colônias frescas das bactérias. As placas

inoculadas foram incubadas a 37°C por até 24 h e então foi analisado o tipo de hemólise (alfa, beta ou gama).

4.5 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTAGONISTA

O teste do antagonismo foi realizado para verificar se os isolados bacterianos apresentavam capacidade de inibir o crescimento de fungos filamentosos considerados patógenos agrícolas (*Fusarium* sp, *Curvularia lunata*, *Drechslera* sp., pertencentes à Micoteca do NEMA (Núcleo Experimental de Micologia Aplicada). O método de dupla cultura foi realizado conforme descrito por Haidar et al. (2016). Para a análise da atividade antagonista, as bactérias foram inoculadas por picada central com agulha microbiológica em placas de Petri com ágar BHI juntamente com um pequeno fragmento da colônia fúngica (ágar e micélio, quadrado de aproximadamente 0,5 x 05 cm). A placas foram incubadas a 29°C por 5 dias e então analisadas visualmente.

4.6 ANTIBIOGRAMA

A determinação do perfil de susceptibilidade a antibióticos foi realizada por disco-difusão, de acordo com a metodologia de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966). Uma suspensão, em salina estéril (NaCl 0,85%) das colônias de uma cultura de até 24h de todos os 8 isolados foi realizada até atingir o padrão de turbidez 0,5 da escala de MacFarland. A suspensão foi semeada em toda a placa de ágar MH, com o auxílio de um *swab* estéril, em quatro planos, para que houvesse crescimento confluyente.

Os discos de papel contendo os antimicrobianos (em concentrações padronizadas) foram adicionados, com o auxílio de uma pinça estéril, na superfície do meio de cultura, sem ultrapassar 15 min após a inoculação da bactéria. Foram utilizados os seguintes antibióticos: AMI (Amicacina 30µg), OXA (Oxacilina 01µg), ERI (Eritromicina 15µg), PEN (Penicilina 10µg), NAL (Ácido Nalidíxico 30µg), CFC (Cefaclor 30µg), AMO (Amoxicilina 10µg), CLI (Clindamicina 02µg), NOR (Norfloxacina 10µg) e GEN (Gentamicina 10µg). As placas foram incubadas em estufa a 36° durante 18 h e em seguida foi realizada a leitura dos resultados com medições dos halos utilizando uma régua.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 BACTÉRIAS IDENTIFICADAS

Os dados obtidos a partir do sequenciamento genético da região rDNA 16S foram comparados com os dados disponíveis do GenBank. Foram identificadas 6 bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, isoladas de blendas de biodiesel e duas outras espécies, provenientes de diesel (TABELA 3).

TABELA 3. BACTÉRIAS ISOLADAS DAS AMOSTRAS DE COMBUSTÍVEL.

Amostra de combustível	Bactéria Isolada
B11-S10-NW	<i>Bacillus cereus</i>
B20-S10-NW	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
B20-S500-NW	<i>Bacillus licheniformis</i>
B11-S10-LW	<i>Bacillus kochii</i>
B11-S500-LW	<i>Bacillus subtilis</i>
B20-S10-HW	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Óleo diesel S10	<i>Solibacillus</i> sp.
Óleo diesel S10	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>

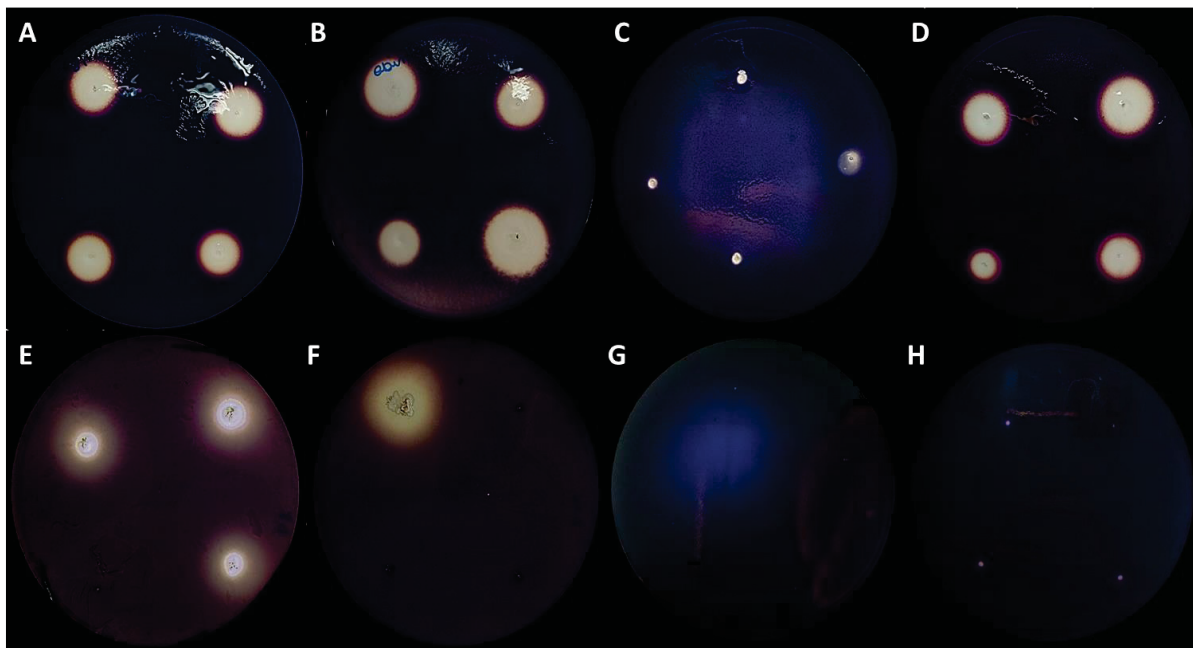
FONTE: O autor (2023)

5.2 POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS E ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Os resultados das atividades amilolítica, proteolítica, lipolítica e celulolítica, bem como o tipo de hemólise em ágar sangue das oito bactérias analisadas neste trabalho, são expressos pelas Figuras 2 a 8 estão interpretados na Tabela 4.

Na Figura 2 é possível observar, através da formação do halo de hidrólise do amido após a revelação com iodo, que os isolados *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens* e *B. kochii* apresentaram uma área de degradação maior, ou seja, ao redor do crescimento da colônia. Pode inferir que a enzima produzida por estas cepas pode estar sendo liberada para o meio externo com maior facilidade se comparado aos resultados observados para os isolados *B. licheniformis* e *B. subtilis*, que apresentaram um halo de degradação menos pronunciado, ao redor da colônia. A bactéria *Solibacillus* sp. não apresentou crescimento e *Exiguobacterium acetylicum* apresentou pouco crescimento e sem atividade amilolítica.

FIGURA 2. TESTE DO POTENCIAL AMILOLÍTICOS DOS ISOLADOS POR INÓCULO EM PERFURAÇÃO DO ÁGAR AMIDO.

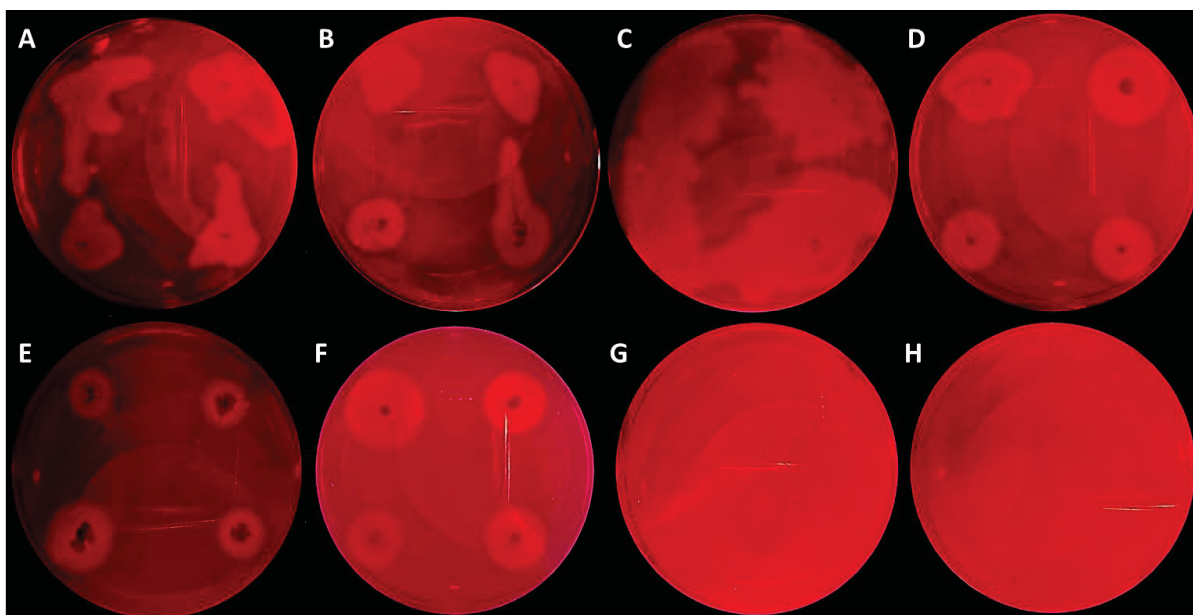


(A) *Bacillus cereus*; (B) *Bacillus amyloliquefaciens*; (C) *Bacillus licheniformis*; (D) *Bacillus kochii*; (E) *Bacillus subtilis*; (F) *Bacillus thuringiensis*; (G) *Solibacillus* sp.; e (H) *Exiguobacterium acetylicum*.

FONTE: O autor (2023)

No teste de atividade celulolítica (FIGURA 3), é possível observar que as bactérias *Solibacillus* sp. e *Exiguobacterium acetylicum*, isoladas do diesel, não apresentaram crescimento e formação de halo para a degradação da celulose. No meio CMC, a visibilidade do halo só ocorre após a revelação com uma solução de vermelho do congo, onde é possível observar, em pouco tempo após o crescimento bacteriano, a utilização do substrato carboximetilcelulose pela bactéria. As espécies de *Bacillus*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. kochii* e *B. thuringiensis* apresentaram uma evidente área de degradação ao redor da colônia. *Bacillus licheniformis* apresentou um crescimento confluyente, sem formação de halo de hidrólise.

FIGURA 3. TESTE DO POTENCIAL CELULOLÍTICO DOS ISOLADOS POR INÓCULO EM PERFURAÇÃO DO ÁGAR CMC.



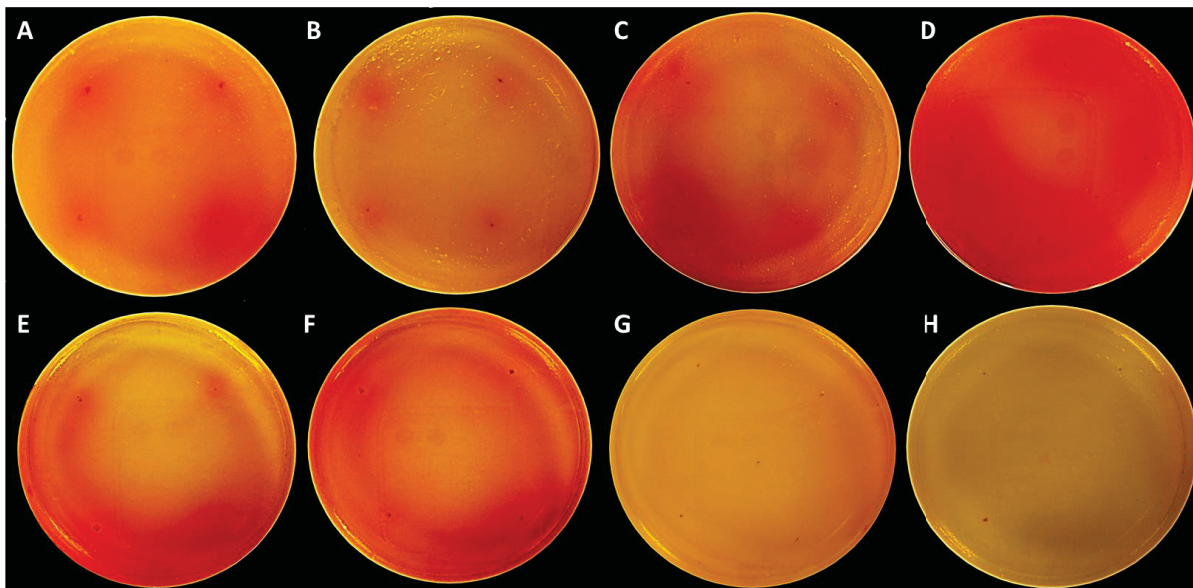
(A) *Bacillus cereus*; (B) *Bacillus amyloliquefaciens*; (C) *Bacillus licheniformis*; (D) *Bacillus kochii*; (E) *Bacillus subtilis*; (F) *Bacillus thuringiensis*; (G) *Solibacillus* sp.; e (H) *Exiguobacterium acetylicum*.

FONTE: O autor (2023).

Para a análise da atividade lipolítica dos isolados bacterianos foram utilizadas diferentes fontes de carbono, para analisar a atividade de lipases e esterases. O meio de cultura utilizando azeite como substrato e vermelho de fenol para revelação (FIGURA 4) permite avaliar a atividade de lipases através da diminuição do pH do meio de cultura, resultando na alteração da cor do meio para vermelho alaranjado. A

diminuição do pH é resultado da ação de lipases sobre os triacilgliceróis do azeite, liberando ácidos graxos e contribuindo para a acidificação do meio.

FIGURA 4. TESTE DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA POR PERFURAÇÃO EM ÁGAR AZEITE COM INDICADOR VERMELHO DE FENOL.



(A) *Bacillus cereus*; (B) *Bacillus amyloliquefaciens*; (C) *Bacillus licheniformis*; (D) *Bacillus kochii*; (E) *Bacillus subtilis*; (F) *Bacillus thuringiensis*; (G) *Solibacillus* sp.; e (H) *Exiguobacterium acetylicum*.

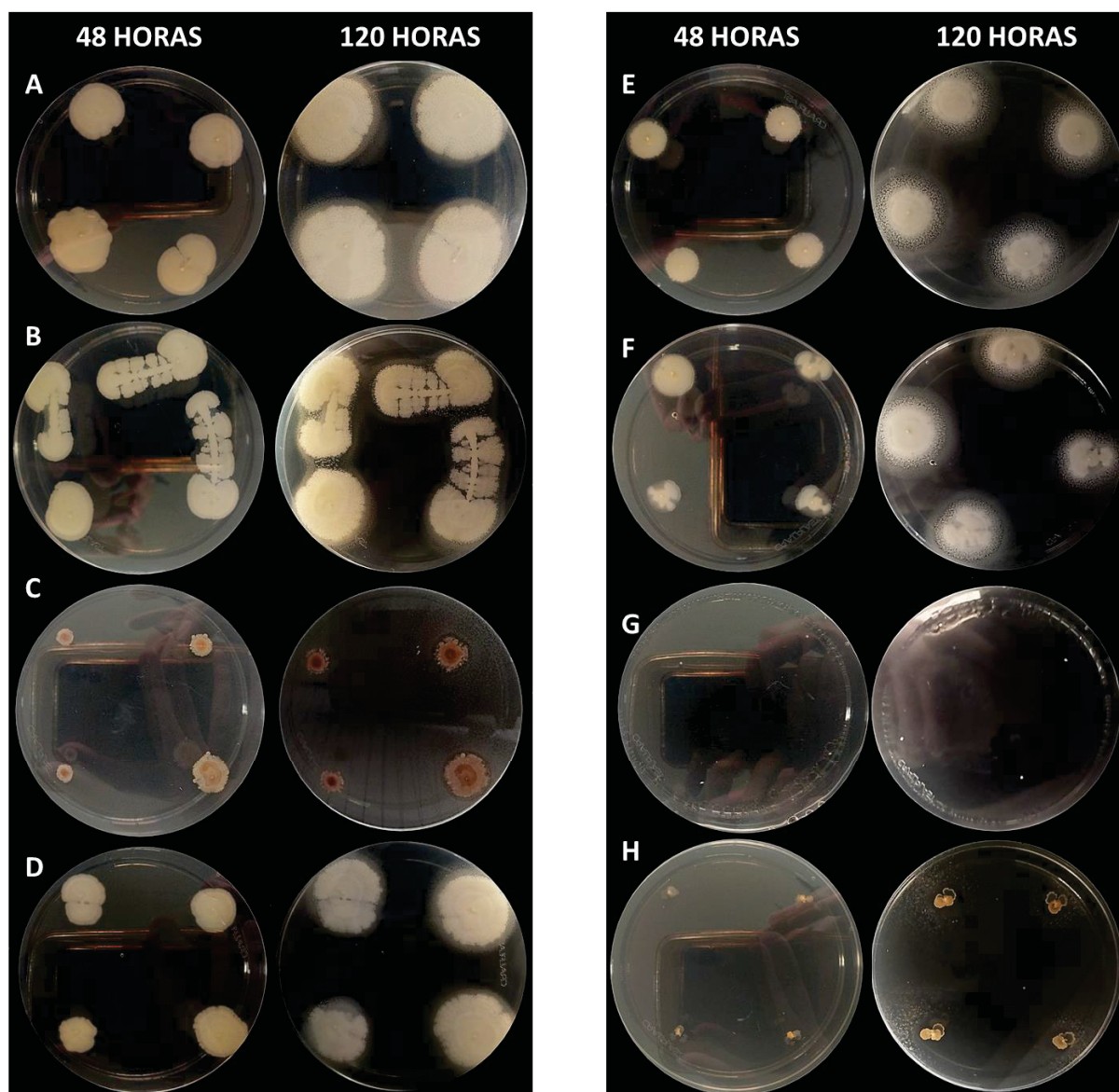
FONTE: O autor (2023)

As bactérias que apresentaram uma mudança de coloração mais pronunciada foram *B. kochii* e *B. thuringiensis*, principalmente ao redor da área de inoculação. Com exceção da *Solibacillus* sp. e *Exiguobacterium acetylicum*, os demais isolados ocasionaram uma leve diminuição do pH do meio.

O segundo protocolo utilizado para avaliação da atividade lipolítica utilizou um surfactante e emulsificante (Tween-80 ou Polissorbato) como substrato. Nesse ensaio, a hidrólise da interpoção libera ácidos graxos que ao se ligarem ao cálcio presente no meio forma cristais (precipitado) ao redor da colônia bacteriana (FIGURA 5). As culturas foram observadas após 48 e 120 h após a inoculação bacteriana. No período de 48 h foi observada precipitação apenas para *B. amyloliquefaciens*. Em 5 dias de incubação (120 h), foi possível observar a formação de precipitado para os demais isolados, com resultados mais pronunciados para *Bacillus licheniformis*, *Bacillus kochii*, *Bacillus subtilis*, e *Bacillus thuringiensis*. Foi possível observar também

que a bactéria *Exiguobacterium acetylicum* apresentou vários pontos sugestivos de cristais de cálcio ao redor da colônia e também em uma maior área da placa teste.

FIGURA 5. TESTE DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA APÓS 48 HORAS E APÓS 120 HORAS POR PERFURAÇÃO EM ÁGAR COM TWEEN 80.

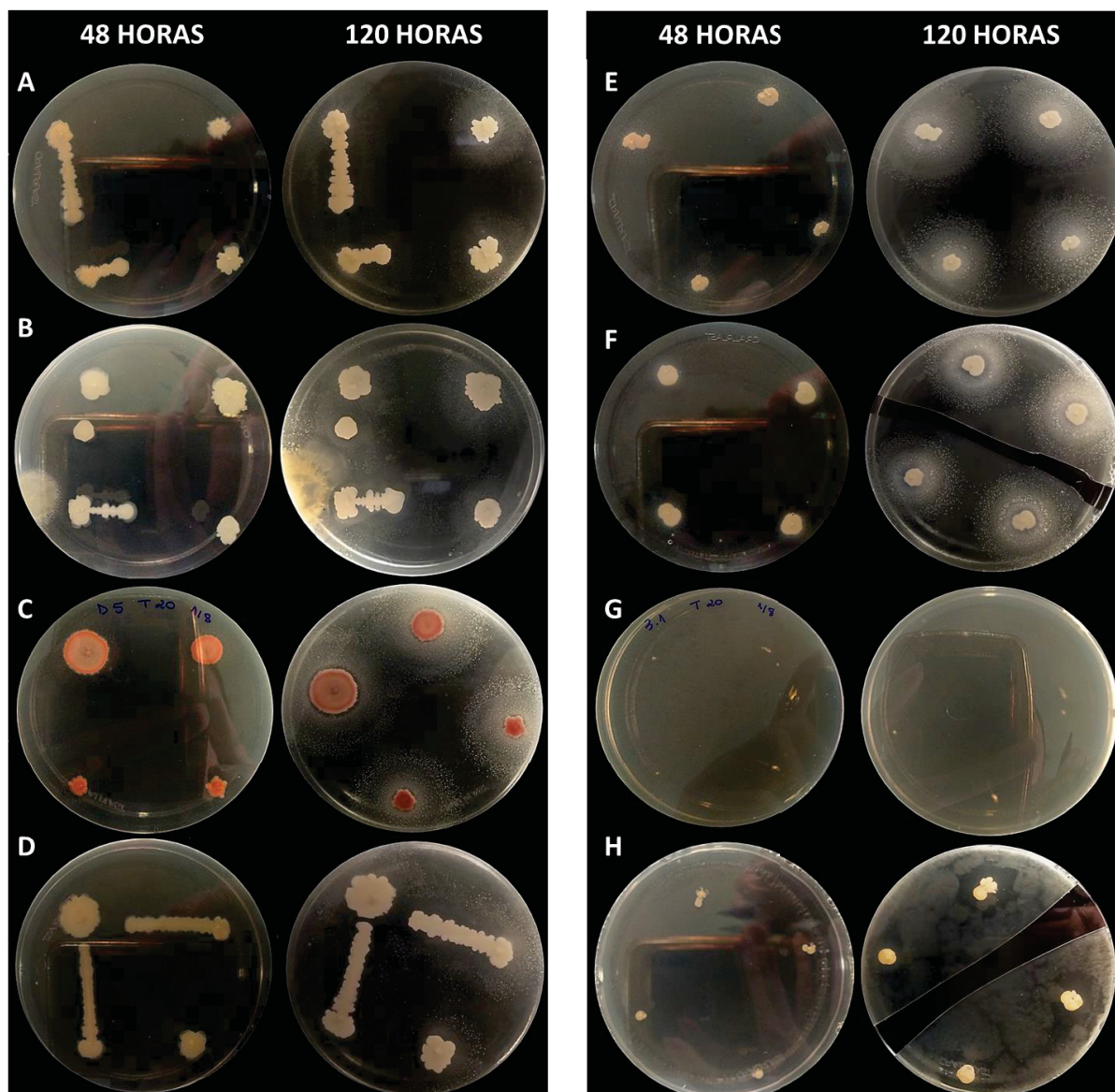


(A) *Bacillus cereus*; (B) *Bacillus amyloliquefaciens*; (C) *Bacillus licheniformis*; (D) *Bacillus kochii*; (E) *Bacillus subtilis*; (F) *Bacillus thuringiensis*; (G) *Solibacillus* sp.; e (H) *Exiguobacterium acetylicum*. A Esquerda leitura em 48 horas após a inoculação e a Direita leitura após 5 dias da incubação.

FONTE: O autor (2023)

O segundo protocolo, utilizando Tween-20 como substrato, foi utilizado para verificar a atividade lipolítica dos isolados bacterianos pela produção de enzimas esterases, pois esse substrato apresenta uma cadeia de ácidos graxos menor, comparando com o ácido oleico presente no Tween-80 (FIGURA 6). Após 48 h de incubação, foi possível observar uma leve formação de precipitado para os isolados *B. licheniformis*, *B. subtilis* e *B. thurigiensis*. Após o período de 120 h, todos os isolados do gênero *Bacillus* apresentaram formação de precipitado ao redor da colônia, e não foi possível observar nenhum resultado para *Solibacillus* sp. e *Exiguobacterium acetylicum*.

FIGURA 6. TESTE DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA APÓS 48 HORAS E APÓS 120 HORAS POR PERFURAÇÃO EM ÁGAR COM TWEEN 20.

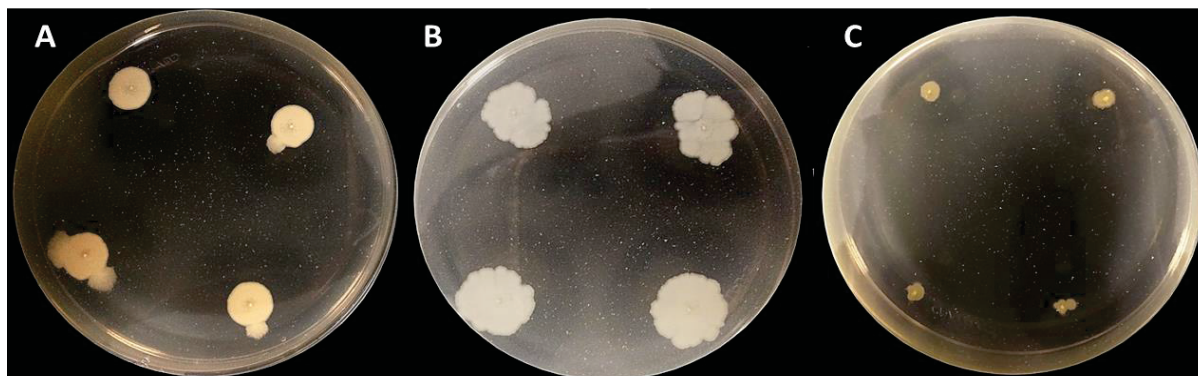


(A) *Bacillus cereus*; (B) *Bacillus amyloliquefaciens*; (C) *Bacillus licheniformis*; (D) *Bacillus kochii*; (E) *Bacillus subtilis*; (F) *Bacillus thuringiensis*; (G) *Solibacillus* sp.; e (H) *Exiguobacterium acetylicum*. A Esquerda leitura em 48 horas após a inoculação e a Direita leitura após 5 dias da incubação.

FONTE: O autor (2023)

No teste da atividade proteolítica foi possível observar que todas as bactérias apresentaram halo de degradação do substrato, sendo mais pronunciado para *B. subtilis*, *B. thuringiensis* e *E. acetylicum*, observado pelo aparecimento de uma zona clara ao redor da área de crescimento (FIGURA 7). Para os demais isolados não foram observado crescimento (dados não mostrados).

FIGURA 7. HALO DE HIDRÓLISE DOS ISOLADOS COM MAIOR POTENCIAL PROTEOLÍTICO

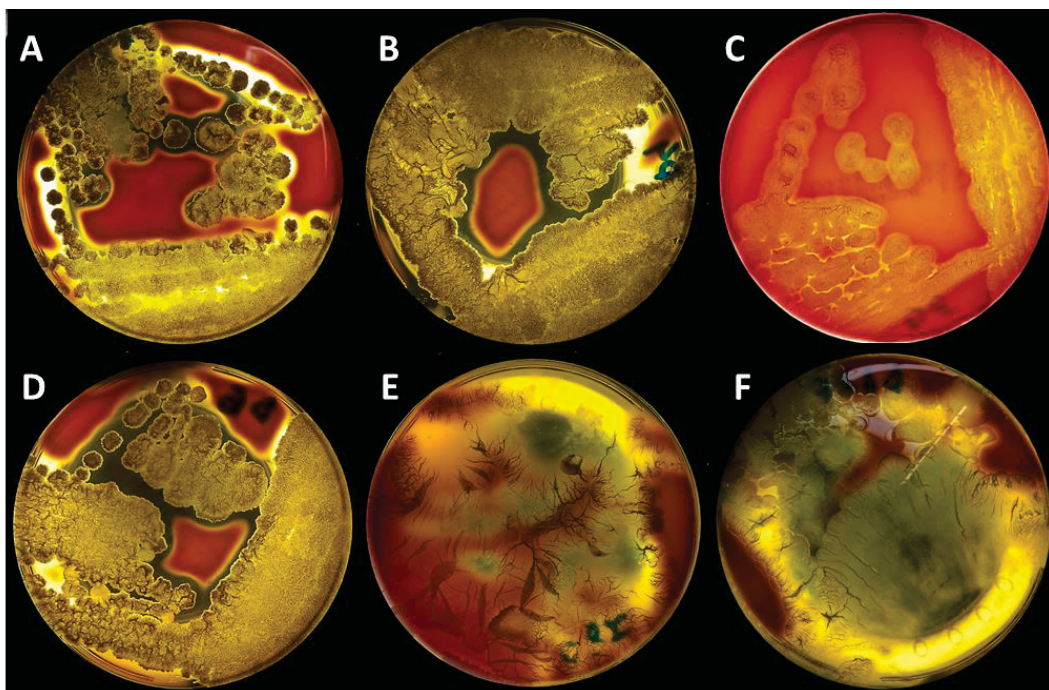


(A) *Bacillus subtilis*; (B) *Bacillus thuringiensis* e (C) *Exiguobacterium acetylicum*.

FONTE: O autor (2023)

Em relação à análise da capacidade hemolítica em ágar sangue (FIGURA 8) foi possível observar que os isolados *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. kochii*, *B. subtilis* e *B. thuringiensis* apresentam halo característico de β -hemólise e apenas a espécie *Bacillus licheniformis* apresentou α -hemólise. A atividade hemolítica de uma bactéria nos mostra sua capacidade em lisar as hemácias do sangue, sendo considerado um fator de virulência. Os microrganismos hemolíticos são divididos em α , β e γ . Através deste resultado, pode-se delimitar algumas futuras utilizações para estes isolados, principalmente aqueles que envolvem potencial na saúde humana. Entretanto é possível utilizar os metabólitos secundários liberados por estas no meio externo como um bioproduto já que em alguns casos estes não carregam essa capacidade, mesmo assim o ideal é realizar teste antes da utilização ou até mesmo buscar por formas de inativar essa característica em específica.

FIGURA 8. ANÁLISE DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE ALGUNS DOS ISOLADOS EM ÁGAR SANGUE POR ESTRIA EM ESGOTAMENTO.



(A) *Bacillus cereus*; (B) *Bacillus amyloliquefaciens*; (C) *Bacillus licheniformis*; (D) *Bacillus kochii*; (E) *Bacillus subtilis*; e (F) *Bacillus thuringiensis*. Os isolados *Solibacillus* sp.; e *Exiguobacterium acetylicum* não foram testados pois foram obtidos posteriormente. FONTE: O autor (2023)

O gênero *Bacillus* compreende diferentes espécies e a grande maioria apresenta alguma importância biotecnológica. São bactérias caracterizadas por uma alta diversidade em relação ao conteúdo de G + C e às capacidades genéticas e metabólicas, incluindo bactérias benéficas e patogênicas. A maioria das bactérias analisadas nesse trabalho não é patogênica. *Bacillus* spp. tem sido grandemente empregadas na produção industrial de enzimas com grande interesse nos setores de detergentes e alimentos; produção de metabólitos primários como vitaminas e ribonucleosídeos; de metabólitos secundários, incluindo bacteriocinas e biosurfactantes, e de formulações que promovem o crescimento de plantas. Além disso, estudos recentes demonstraram que essas bactérias podem produzir produtos químicos finos com aplicações biotecnológicas interessantes, como, por exemplo, pigmentos carotenóides e uma variedade de biopolímeros, incluindo ácidos poli-glutâmico e láctico ((RADDADI et al., 2012). Estas descobertas abrem perspectivas para novas aplicações biotecnológicas de *Bacillus* e espécies relacionadas.

Bacillus cereus é uma bactéria beta-hemolítica gram-positiva, de forma cilíndrica, endêmica, que vive no solo. Algumas cepas são prejudiciais aos seres humanos e causam intoxicação alimentar, enquanto outras cepas podem ser benéficas, como os probióticos para animais (SCHOENI e WONG, 2005).

Bacillus amyloliquefaciens é uma espécie de bactéria gram-positiva benéfica, capaz de colonizar as raízes de plantas e serve para diferentes propósitos de uso agrônômico: desde a sua utilização para promoção do crescimento vegetal à supressão de fitopatógenos. Tais benefícios estão relacionados à alta capacidade desse microrganismo em sintetizar diversas enzimas e metabólitos secundários benéficos às culturas agrícolas, como antibióticos e sideróforos (WOLDEMARIAMYOHANNES et al., 2020).

Bacillus licheniformis é uma bactéria comumente encontrada no solo. É uma bactéria gram-positiva, mesofílica, formadora de esporos de alto interesse biotecnológico com numerosos usos atuais e potenciais, incluindo a produção de compostos bioativos que são aplicados em uma ampla gama de campos, como aquicultura, agricultura, alimentos, biomedicina e farmacêutica. Além disso, tem uso generalizado como probiótico, outras aplicações biotecnológicas de cepas de *B. licheniformis* incluem: biofloculação, biomineralização, produção de biocombustíveis, biorremediação e atividade anti-biofilme (MURAS et al., 2021). Embora as autoridades tenham aprovado o uso de *B. licheniformis* como aditivo alimentar em todo o mundo devido à ausência de potencial toxigênico, alguns probióticos contendo esta bactéria são considerados inseguros devido à possível transferência de genes de resistência a antibióticos.

Bacillus kochii são bastonetes Gram-positivos, estritamente aeróbicos, móveis, catalase-positivos, formadores de endósporos, recentemente relatada (SEILER et al. 2012). Não há registros na literatura sobre a utilização dessa bactéria para fins biotecnológicos.

Bacillus subtilis é uma bactéria Gram-positiva que pode sobreviver em ambientes adversos através da formação de esporos da esporulação, um processo que é normalmente desencadeado pela falta de nutrientes (SETLOW et al., 2017). Apresenta importantes aplicações industriais devido à sua fácil manipulação genética, características de cultivo favoráveis para fermentação em larga escala, capacidade superior de secreção de proteínas e *status* geralmente reconhecidos como seguro (GRAS) (ZHANG et al., 2020).

Bacillus thuringiensis é uma bactéria entomopatogênica que produz diferentes tipos de proteínas cuja toxicidade específica foi demonstrada contra uma ampla gama de ordens de insetos, nematóides, ácaros, protozoários e células cancerígenas humanas (BEL et al., 2020). É uma bactéria de solo presente em todos os continentes. É gram-positiva, aeróbica e capaz de esporular para sobreviver a condições ambientais adversas.

Solibacillus sp. é um gênero de bactérias Gram positivas, em forma de bastonete, formadoras de esporos. É descrita como um microrganismo produtor de biossurfactante, utilizados em técnicas de biorremediação, se desenvolvem em óleos, utilizando-os como fonte de hidrocarbonetos, a produção de biossurfactantes também promove a redução da tensão superficial (KEBER, 2020).

As bactérias do gênero *Exiguobacterium* são anaeróbios facultativos Gram-positivos que têm sido frequentemente isolados de vários habitats, incluindo água do mar, sedimentos marinhos, algas marinhas, solo, água doce, rizosfera vegetal, e até mesmo ambientes extremos, como lago salgado e geleiras (OH et al., 2018). *Exiguobacterium acetylicum* é uma bactéria identificada com alto potencial de biorremediação e alta eficiência na degradação de petróleo bruto (DELEGAN et al., 2021).

Dentre os 8 isolados obtidos das blendas, 6 são pertencentes a espécie *Bacillus*, onde de acordo com a literatura esses microrganismos podem viver em diferentes *habitats*, com capacidade de formar endósporos, fornecendo a eles uma alta resistência a calor, seca, produtos químicos e radiação, permitindo sua sobrevivência em condições não controladas por longos períodos de tempo (MANDIC-MULEC et al., 2015).

Bacillus spp., são conhecidos no mundo da pesquisa pela sua ampla capacidade de sintetizar enzimas, principalmente as hidrolíticas que são de extrema importância para indústrias farmacêuticas, alimentícias, têxtil, cosméticos e entre outros (SILVA, 2021).

TABELA 4. POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS.

Bactérias	Amilolítica	Proteolítica	Lipolítica Tween 80	Lipolítica Tween 80 5 dias	Lipolítica Tween 20	Lipolítica Tween 20 5 dias	Lipolítica azeite	Celulolítica	Hemólise
<i>Bacillus cereus</i>	++	+	-	++	-	+++	++	++	β
<i>B. amyloliquefaciens</i>	++	+	+	++	-	+++	+	++	β
<i>B. licheniformis</i>	+	+	-	+++	+/-	+++	++	++	α
<i>B. kochii</i>	++	+	-	+++	-	+++	+++	++	β
<i>B. subtilis</i>	+	++	+/-	+++	+	+++	++	++	β
<i>B. thuringiensis</i>	+	++	+/-	+++	+	+++	+++	++	β
<i>Solibacillus</i> sp.	-	++	-	-	-	-	-	-	NA
<i>E. acetylicum</i>	-	+	-	++	-	-	-	-	NA

+ halo ou mudança de cor só no crescimento da colônia

++ halo ou mudança de cor ao redor do crescimento da colônia

+++ halo ou mudança de cor além das bordas do crescimento da colônia

- ausência de halo ou mudança de cor

+/- leve formação de precipitado

NA: não analisado

Fonte: O autor (2023)

De acordo com a Tabela 4 onde descreve todos os resultados obtidos para as atividades degradadoras, pode-se observar um alto potencial biotecnologias para todos isolados da espécie *Bacillus*, sendo o gênero *B. kochii* de maior destaque, pois é uma das espécies dentro dos gêneros onde se encontra baixo numero de artigo publicado, o que se acredita ser um gênero pouco encontrado considerados os

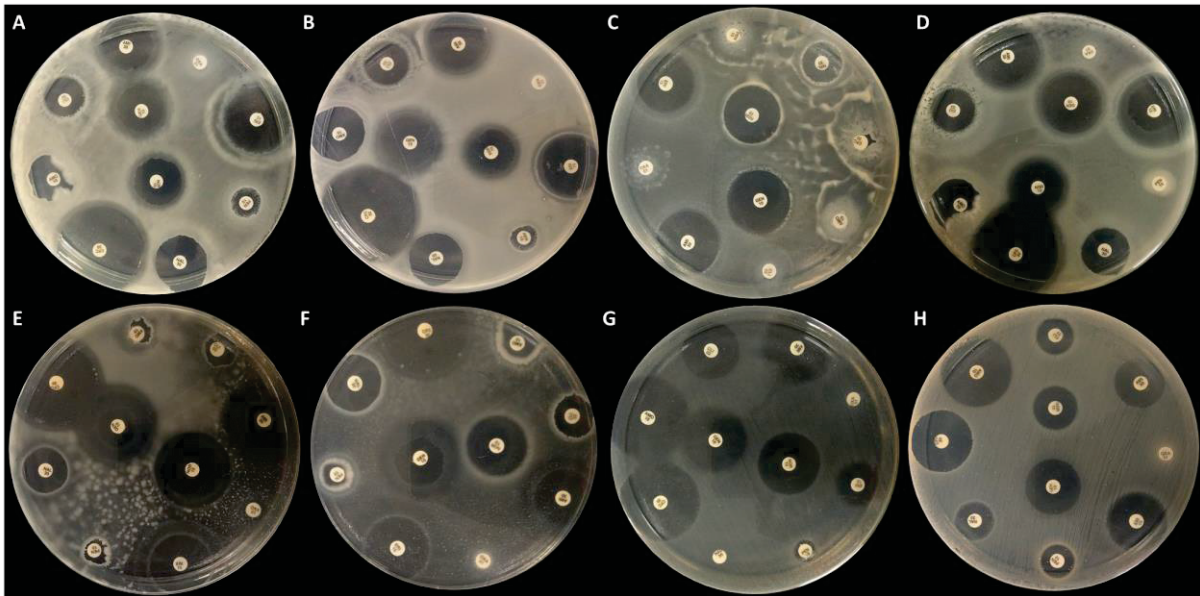
demais popularmente conhecidos cuja a descoberta foi publicada por Seiler et al., (2011).

Com os altos potenciais de degradação e grande gama de utilizações, pontos para se escolher a melhor cepa para produção de determinadas enzimas também pode estar relacionado ao seu nível de patogenicidade, já que podem ser utilizadas em indústrias farmacêuticas, cosméticos e alimentícia. Uma das espécies mais conhecidas por sua alta patogenicidade são *B. cereus* e *B. anthracis* que são excelentes produtores de bioprodutos, entretanto estão na lista dos microrganismos patogênicos a humanos (BORRISS et al., 2019).

Pensando nas grandes mudanças que as indústrias vêm buscando afim de reduzir o consumo de produtos químicos que causam diversos danos ao meio ambiente, as alternativas sustentáveis vêm ganhando destaque como uma ótima válvula de escape (DILNASHIN et al., 2020). Entretanto, Saxena et al. (2019) salienta a importância da realização de estudos voltados para a produtividade em campo, ou seja, necessário testes in vivo.

5.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Através da análise do perfil de susceptibilidade a diferentes antibióticos, pode-se observar que os isolados bacterianos apresentam um alto perfil de sensibilidade para a maior parte dos antibióticos testados (FIGURA 9 e TABELA 5). Foi observado que os microrganismos apresentaram halos de inibição de crescimento mais pronunciados para os antibióticos Cefaclor, Eritromicina e Amicacina, maiores que 40 mm. Também foi possível observar que *B. amyloliquefaciens* apresentou um maior nível de sensibilidade a todos os antibióticos testados, com exceção da Oxacilina que teve crescimento ao redor do disco para todas as cepas testadas, porém isso pode ser explicado por ser um antibiótico indicado no tratamento de infecções por estafilococos produtores de penicilinase sensíveis ao fármaco. No entanto, devido à ausência de dados disponíveis na literatura sobre esses microrganismos, não foi possível estabelecer um critério para definir a resistência, sensibilidade ou sensibilidade dose dependente. De maneira geral, pode-se concluir que a maioria das bactérias apresentam alguma inibição de crescimento frente aos antibióticos testados, podendo inferir que são seguras para serem utilizadas em grande escala.

FIGURA 9. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

(A) *Bacillus cereus*; **(B)** *Bacillus amyloliquefaciens*; **(C)** *Bacillus licheniformis*; **(D)** *Bacillus kochii*; **(E)** *Bacillus subtilis*; **(F)** *Bacillus thuringiensis*; **(G)** *Solibacillus* sp.; e **(H)** *Exiguobacterium acetylicum*.

TABELA 5. PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS.

Bactérias	Antibióticos - Concentração (µg/disco)									
	AMI 30	OXA 01	ERI 15	PEN 10	NAL 30	CFC 30	AMO 10	CLI 02	NOR 10	GEN 10
<i>B. cereus</i>	22	-	28	14	26	40	20	18	21	20
<i>B. amyloliquefaciens</i>	25	-	28	12	24	42	25	20	20	23
<i>B. licheniformis</i>	28	-	25	-	18	-	-	-	25	28
<i>B. kochii</i>	30	-	20	-	21	40	26	20	25	28
<i>B. subtilis</i>	25	-	27	8	20	35	-	10	25	17
<i>B. thuringiensis</i>	29	-	18	10	-	36	38	25	28	28
<i>Solibacillus</i> sp.	23	-	26	15	18	29	32	16	20	25
<i>E. acetylicum</i>	22	-	28	14	26	40	20	18	21	20

Legenda: Os números na tabela indicam as medidas, em milímetros, dos halos de inibição de crescimento das bactérias. O símbolo - representa ausência de halo ou resistência microbiana ao antibiótico. Fonte: O autor (2023)

Através da análise visual e medida de halo é possível analisar que todos os isolados apresentaram uma resistência significativa para a Oxacilina e baixa sensibilidade para Penicilina. Também é possível observar que todos os isolados apresentaram uma média de sensibilidade em 7 antibióticos entre os 10, ou seja, 70% dos antibióticos demonstraram ser eficientes sob essas bactérias.

Durante um estudo da susceptibilidade a antibióticos de cepas de *Bacillus* isoladas de diferentes ecossistemas aquáticos extremos do Equador, as espécies *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. kochii* e *B. thuringiensis*, apresentaram resistências a Eritromicina e Oxacilina, sendo que a espécie *B. kochii* também apresentou sensibilidade para a Penicilina e resistências a Clindamicina, assim como *B. subtilis*. (GONZÁLEZ et al., 2021) Dentro deste estudo, foram testados 7 antibióticos (Ampicilina, Ciprofloxacino, Clindamicina, Gentamicina, Oxacilina e Penicilina) em 19 isolados do gênero *Bacillus* sendo que dentro da mesma espécie alguns apresentaram resistência enquanto outro isolado apresenta sensibilidade, nestes estudos a média de antibióticos sensíveis para cada isolado é de 2, ou seja, 40% dos antibióticos apresentaram eficiência sob os isolados

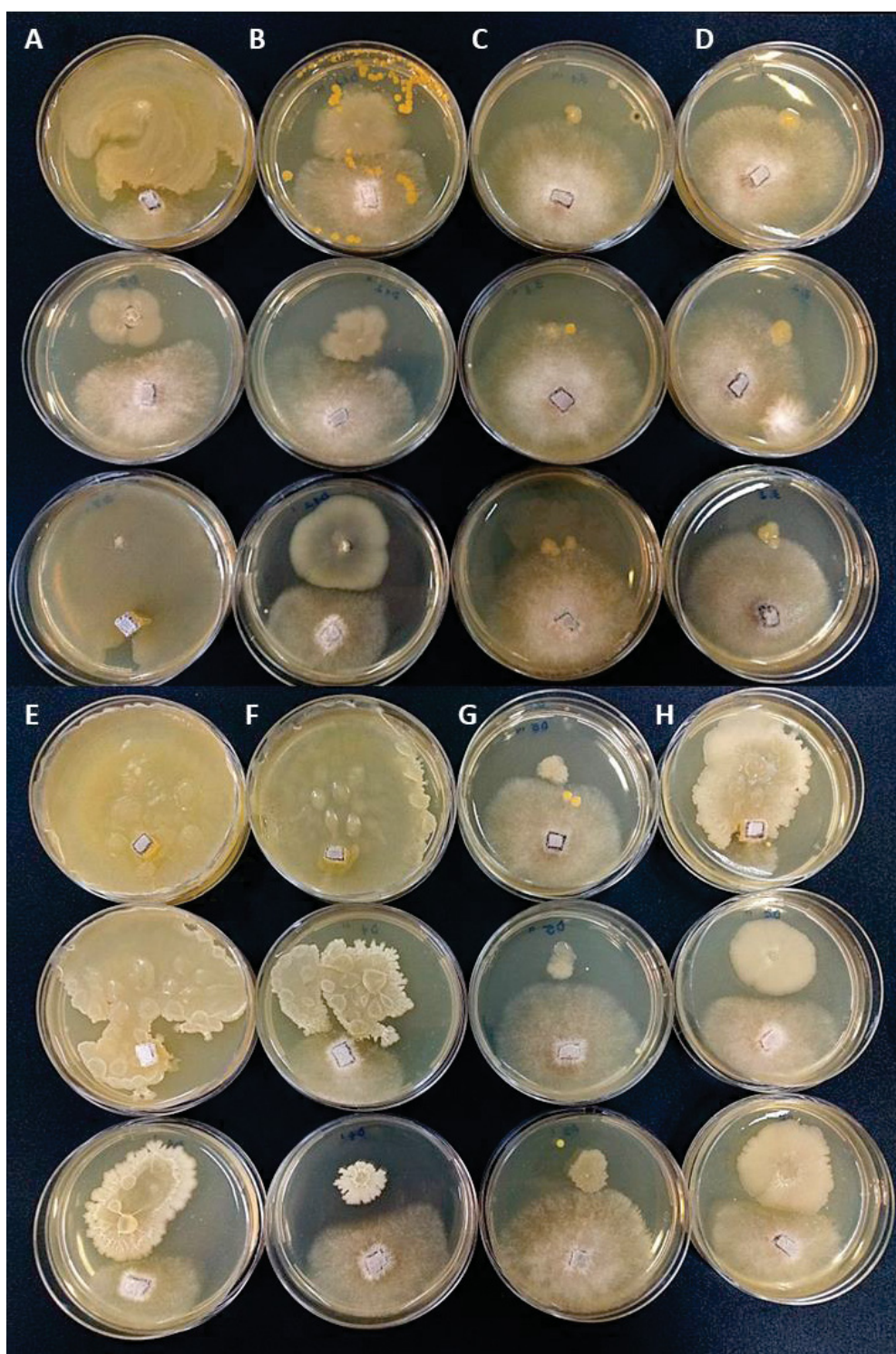
As variações entres os resultados da-se exatamente pela fonte onde o microrganismo é isolado. O mesmo carrega com si adaptações de até mutações obtidas de outros microrganismos que morreram e deixaram seu material genético

disponível. Com isso, entende-se a importância de estudar este perfil de susceptibilidade, para auxiliar na descoberta por novos antibióticos e até mesmo traçar um uso mais segura para as cepas de interesse.

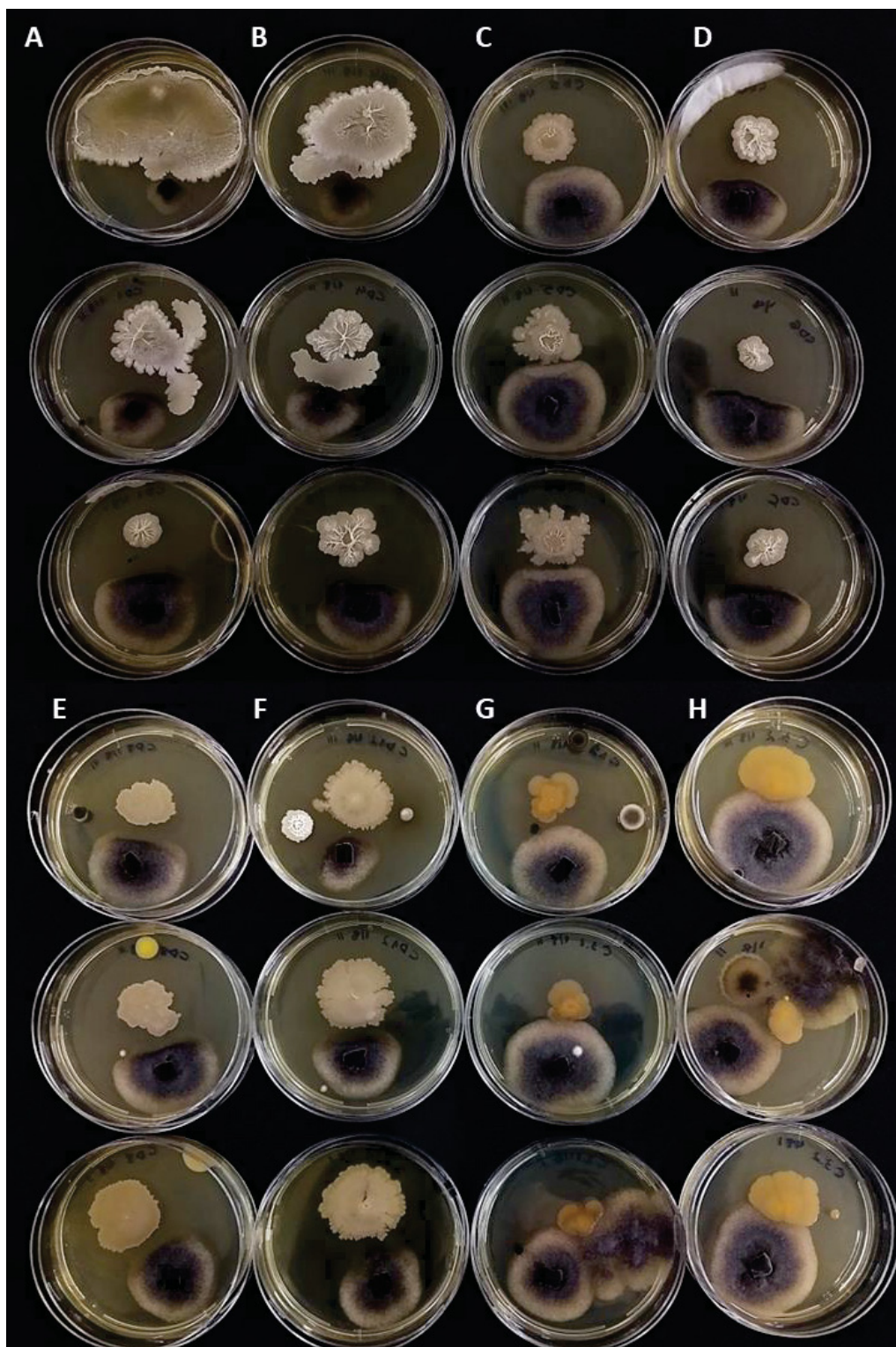
5.4 ANTAGONISMO DAS BACTÉRIAS CONTRA FUNGOS FILAMENTOSOS

Nesse ensaio foi possível observar que poucos isolados apresentaram inibição do crescimento fúngico, sendo os melhores resultados para *B. kochii* e *B. cereus*, que apresentaram atividade antagonista para os três fungos testados (FIGURAS 10, 11 e 12 e TABELA 6). Podeseobservar também que nenhum dos fungos foi capaz de crescer de forma confluenta na presença das bactérias, com exceção de *Solibacillus* sp e *E. acetylicum*.

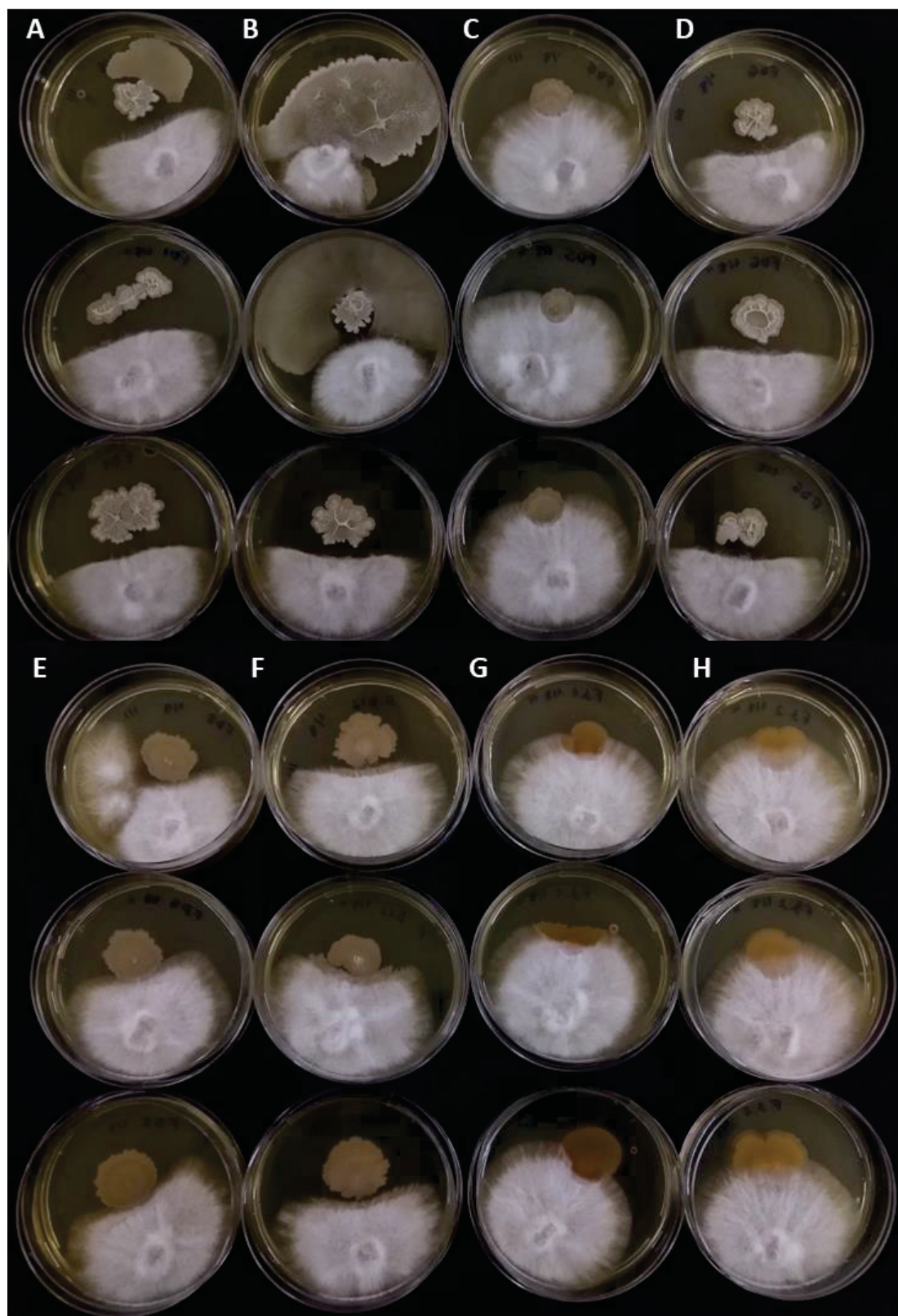
Bactérias e fungos frequentemente compartilham um substrato comum, e sua proximidade espacial em muitos ambientes leva a interações sinérgicas ou antagonicas (MILLE-LINDBLOM et al., 2006). Sendo os microrganismos importantes fontes de compostos bioativos, na natureza, a competição por recursos limitados e antagonismo são características dos micro-habitats onde se encontram os microrganismos, que favorecem vários mecanismos de defesa que dependem principalmente da produção de metabólitos secundários bioativos. A competição entre microrganismos pode induzir a expressão de genes que estavam silenciados, pois representa uma condição de estresse (MARMANN et al., 2014). Avaliar a atividade antagonista das bactérias isoladas, nos permitem avaliar potenciais biotecnológicos futuros,

FIGURA 10. ATIVIDADE ANTAGONISTA DOS ISOLADOS SOB *Drechslera* sp.

(A) *Bacillus cereus*; **(B)** *Bacillus amyloliquefaciens*; **(C)** *Bacillus licheniformis*; **(D)** *Bacillus kochii*; **(E)** *Bacillus subtilis*; **(F)** *Bacillus thuringiensis*; **(G)** *Solibacillus* sp.; e **(H)** *Exiguobacterium acetylicum*.

FIGURA 11. ATIVIDADE ANTAGONISTA DOS ISOLADOS SOB *Curvularia lunata*

(A) *Bacillus cereus*; (B) *Bacillus amyloliquefaciens*; (C) *Bacillus licheniformis*; (D) *Bacillus kochii*; (E) *Bacillus subtilis*; (F) *Bacillus thuringiensis*; (G) *Solibacillus* sp.; e (H) *Exiguobacterium acetylicum*.

FIGURA 12. ATIVIDADE ANTAGONISTA DOS ISOLADOS SOB *Fusarium* sp.

(A) *Bacillus cereus*; (B) *Bacillus amyloliquefaciens*; (C) *Bacillus licheniformis*; (D) *Bacillus kochii*; (E) *Bacillus subtilis*; (F) *Bacillus thuringiensis*; (G) *Solibacillus* sp.; e (H) *Exiguobacterium acetylicum*.

TABELA 6. ANTAGONISMO BACTÉRIAS E FUNGOS.

Bactérias	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Drechslera</i> sp.
<i>Bacillus cereus</i>	++	++	--
<i>B. amyloliquefaciens</i>	+	+	+
<i>B. licheniformis</i>	-	+	+
<i>B. kochii</i>	++	++	++
<i>B. subtilis</i>	+	++	+
<i>B. thuringiensis</i>	+	++	+
<i>Solibacillus</i> sp.	-	-	-
<i>E. acetylicum</i>	-	-	-

- não inibiu / -- inconclusivo

+ inibiu mas ficou em contato com a colônia de bactéria

++ inibiu e não teve contato com a colônia

Fonte: O autor (2023)

Dentro dos resultados obtidos é possível analisar que o *B. kochii* apresenta uma maior atividade antagonística frente aos fungos utilizados, caracterizando com uma excelente cepa para estudos de atividade antifúngica através de extratos a fim de descobrir qual o metabólito responsável por essa característica, podendo até mesmo ter o gene identificado e utilizados para produção de agente antifúngico ou controle biológico de doenças causadas em plantas através de fungos fitopatogênicos.

De acordo com Khadiri et al., (2023), descreve que uma cepa de *B. cereus* apresentou uma potente eficiência em controle de fungos patogênicos comuns pós-colheita de maçãs e frutas cítricas, onde um filtrado sem células mostrou efeito inibitório in vitro para a grande maioria de patógenos estudados.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho apresenta um estudo de prospecção de bactérias degradadoras de substâncias orgânicas como amido, celulose, lipídeos, proteínas isoladas de blendas de diesel. Tendo então uma identificação de 8 isolados bacterianos, sendo 6 deles do gênero *Bacillus*, onde todos apresentam resultados de atividade degradadora. O maior destaque entre os testes fica a cargo da atividade lipolítica onde foi possível avaliar a presença de lipases e esterases que tem amplas utilizações em industrias mas que também podem ser altamente revertida para biorremediação. Um outro destaque fica para as celulasas, onde todas as cepas de *Bacillus* apresentaram um alto poder de degradar a celulose, um polímero altamente resistente com um grande potencial de utilização de industrias afim de melhorar o processo de produção. Dentre todos os isolados utilizados para a atividade antagonista, as cepas *B. cereus*, *B. subtilis* e *B. thuringiensis* apresentaram de forma geral uma boa atividade inibitória, entretanto, o isolado de melhor resultado foi *B. kochii*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, S., KHAN, S. A., HAMAYUN, M., LEE, I. J. The Recent Advances in the Utility of Microbial Lipases: A Review. **Microorganisms**, v. 11, n. 2, p. 510, 2023.

ALMEIDA, J. M., MARTINI, V. P., IULEK, J., ALNOCH, R. C, MOURE, V. R, MÜLLER-SANTOS, M., KRIEGER N. Biochemical characterization and application of a new lipase and its cognate foldase obtained from a metagenomic library derived from fat-contaminated soil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 137, p. 442-454, 2019.

ANDERLE, G. A. Efetividade da *Bacillus megaterium* no tratamento de efluente de abate de peixes. Dissertação de mestrado. Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, 2021.

AZAMBUJA, A. O., CAZAROLLI, J. C., TABELAS, P. D. DE, BUCKER, F., CORREA, C., CASAGRANDA, J. C., FERRÃO, M. F., CELIKKOL, S., OGAWA. A., BONIFAY, V.; SUNNER, J. A., BEECH, I. B., BENTO, F. M. Effect of sulfur content on microbial composition and biodegradation of a Brazilian diesel and biodiesel blend (B10). **Energy & Fuels**, v. 31, p. 12305-12316, 2017.

BASTIAENS, L., SPRINGAEL, D., WATTIAU, P., HARMS, H., RUPERT deWACHTER, R., VERACHTERT, H., DIELS, L. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1834-1843, 2000.

BAUER, A. W., KIRBY, W. M. M., SHERRIS, J. C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BAWA, N., BEAR, D., HILL, G.; NIU, C., ROESLER, W. Fermentation of glucose and starch particles using an inexpensive medium. **Chemical Technology and Biotechnology**, v.85, n. 4, p. 441-446, 2010.

BEHERA, B C., PARIDA, S., DUTTA, S. K., THATOI, H. H. Isolation and Identification of Cellulose Degrading Bacteria from Mangrove Soil of Mahanadi River Delta and Their Cellulase Production Ability. **American Journal of Microbiological Research**, v. 2, n. 1, p. 41-46, 2014.

BEKER, S. A., DA SILVA, Y. P., BÜCKER, F., CAZAROLLI, J. C., DE QUADROS, P. D., PERALBA, M. D. C. R., BENTO, F. M. Effect of different concentrations of tert-butylhydroquinone (TBHQ) on microbial growth and chemical stability of soybean biodiesel during simulated storage. **Fuel**, v. 184, p. 701-707, 2016.

BEL, Y., FERRÉ, J., HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P. *Bacillus thuringiensis* Toxins: Functional Characterization and Mechanism of Action. **Toxins (Basel)**, v. 12, n. 12, p. 785, 2020.

BENTO, F. M., CAMARGO, F. A. O., OKEKE, B. C., & FRANKENBERGER, W. T. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. **Microbiological Research**, v. 160, n. 3, p. 249–255, 2005.

BENTO, F. M., GAYLARDE, C. C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 47, n. 2, p. 107-112, 2001.

BENTO, F. M., PERALBA, M. C. R., FERRÃO, M. F., ZIMMER, A. R., AZAMBUJA, A. O., BARBOSA, C. S., BUKER, F., CAZAROLLI, J. C., QUADROS, P. D., BEKER, S. A. Diagnóstico, monitoramento e controle da contaminação microbiana em biodiesel e misturas durante o armazenamento. Brasília: Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico – CDT, UnB, Cap. 5, p. 111 – 174, 2016.

BENTO, F. M.; VISCARDI, S. K. R.; DARODA, R.; MENENDEZ, A. G.; CAMARGO, F. A. O.; GAYLARDE, C. C. Suscetibilidade do óleo diesel com 2 e 5% de biodiesel à contaminação microbiana durante a estocagem. **Revista Biodiesel**. v. 24, p. 24-26, 2006.

BENTO, F.M., CAMARGO, F. A. O., OKEKE, B. C., & FRANKENBERGER, W. T. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. **Microbiological Research**, v. 160, n. 3, p. 249–255, 2005.

BOONCHAN, S., BRITZ, M. L., STANLEY, G. A. Degradation and mineralization of high- molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1007-1019, 2000.

BORRIS, R., WU, H., GAO, X. Secondary metabolites of the plant growth promoting model Rhizobacterium *Bacillus velezensis* FZB42 are involved in direct suppression of plant pathogens and in stimulation of plant-induced systemic resistance. **Discovery and Applications**, p.157–168, 2019

BUCKER, F., BARBOSA, C. S., QUADROS, P. D., BUENO, M. K., FIORI, P., TE HUANG, C., FRAZZON, A. P. G., FERRÃO, M. F. CAMARGO, F. A. O, BENTO, F. M. Fuel biodegradation and molecular characterization of microbial biofilms in stored diesel/biodiesel blend B10 and the effect of biocide. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 95, p. 346-355, 2014.

BUCKER, F., SANTESTEVAN, N. A., ROESCH, L. F., JACQUES, R. J. S., PERALBA, M. D. C. R., CAMARGO, F. A. O., & BENTO, F. M. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 172-178, 2011.

BURHAN, U., NISA, C., GÖKHAN, C., ÖMER, ASHABIL, A., OSMAN, G. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 10, p. 1397–1403, 2003.

CAZAROLLI, J. C. Potencial deterigênico da microbiota nativa de biodiesel de soja (RS), Brasil. **Tese**. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – UFRGS, Porto Alegre, 2019.

CAZAROLLI, J. C., BOELTER, G., DE LIMA, A. M., HENGLES, T., CORREA, C., PERALBA, M. C., ... & BENTO, F. M. Nature of Insoluble Material Found in the Bottom of Soybean Biodiesel Storage Tank: Chemical and Microbiological Approach. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, p. 2034-2045, 2018.

CHANDRA, P., ENESPA, SINGH, R., ARORA. P. K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 169, 2020.

CHANTARASIRI, A. Diversity and activity of aquatic cellulolytic bacteria isolated from sedimentary water in the littoral zone of Tonle Sap Lake Cambodia. **Water**, v. 13, n. 13, p. 1797, 2021.

CHAO, Y., LIU, N., ZHANG, T., & CHEN, S. Isolation and characterization of bacteria from engine sludge generated from biodiesel-diesel blends. **Fuel**, v. 89, n.1, p. 3358–3364, 2010.

CHUNG, Y. C., CHEN, H. C., SHYU, Y. T., HUA, J. Temperature and water effects on the biodeterioration for marine fuel oil. **Fuel**, v. 79, n. 12, p. 1525-1532, 2000.

CRUZ, L. M., SOUZA, E. M., WEBER, O.B.; BALDANI, J.I., DÖBEREINER, J., PEDROSA, F.O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananascomosus (L.) Merrill*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2375-2379, 2001.

DANILOVA, I.; SHARIPOVA, M. The practical potential of Bacilli and their enzymes for industrial production. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1782, 2020.

DANSO, B., ALI, S. S., XIE, R., SUN, J. Valorisation of wheat straw and bioethanol production by a novel xylanase-and cellulase-producing *Streptomyces* strain isolated from the wood-feeding termite *Microcerotermes* species. **Fuel**, v. 310:12233, 2022.

DELEGAN, Y., KOCHAROVSKAYA, Y., BOGUN, A., SIZOVA, A., SOLOMENTSEV, V., IMINOVA, L., ... & SOLYANIKOVA, I. Characterization and genomic analysis of *Exiguobacterium alkaliphilum* B-3531D, an efficient crude oil degrading strain. **Biotechnology Reports**, v. 32, 2021.

DILNASHIN, H.; BIRLA, H.; HOAT, T.X.; SINGH, H.B.; SINGH, S.P.; KESWANI, C. 2020. Applications of agriculturally important microorganisms for sustainable crop production. **INC**, p. 403–416, 2020

DODOS, G. S., KONSTANTAKOS T., LONGINOS S., ZANNIKOS F. Effects os microbiological contamination in the quality of biodiesel fuels. In: **International Conference on Environmental Science and Technology, Rhodes, Greece**, 2011.

ELLAIAH, P., SRINIVASULU, B. ADINARAYANA, K. A review on microbial alkaline proteases. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 61, p. 690-704, 2002.

FACCHIN, S. Isolamento de microrganismos e seleção de enzimas microbianas com aplicações biotecnológicas no tratamento de esgotos. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Genética Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

FATTAH, I. R., MASJUKI, H. H., KALAM, M. A., HAZRAT, M. A., MASUM, B. M., IMTENAN, S., ASHRAFUL, A. M. Effect of antioxidants on oxidation stability of biodiesel derived from vegetable and animal-based feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, p. 356-370, 2014.

GODFREY, T., WEST, S. Introduction to industrial enzymology. Industrial enzymology, Mac. Millan Press, London, p. 1-8, 1996.

GONG, G., WU, B., LIU, L., LI, J., HE, M., HU, G. Enhanced biomass and lipid production by light exposure with mixed culture of *Rhodotorula glutinis* and *Chlorella vulgaris* using acetate as sole carbon source *Bioresource Technology*, v. 364, 128139, 2022.

GONZÁLES, M., VITERI, F., VILLACÍS, L., ESCOBAR, J., ARAUJO, L., GONZÁLES, A., MEDINA, G., ARAQUE, J., ANDUEZA, F. Perfiles de susceptibilidade a los

antibióticos em cepas del genero *Bacillus* aisladas de ambientes acuáticos extremos del Ecuador. **An. Real Acad. Farm**, v. 87, n. 1, p. 27-34, 2021.

GUPTA, R., GIGRAS, P., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V.K., CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003.

Haidar, R., RouDET, J., BONNARD, O., DUFOUR, M. C., CORIO-COSTET, M. F., FERT, M., GAUTIER, T., DESCHAMPS, A., FERMAUD, M. Screening and modes of action of antagonistic bacteria to control the fungal pathogen *Phaeoemoniella chlamydospora* involved in grapevine trunk diseases. **Microbiological Research**, v. 192, p. 172-184, 2016.

HASELROTH, K. J., WILKE, P., DALLA COSTA, I. M., ROTTA, V. M. L. FIORINI, A., HERMES, A. Effectiveness of *Aeromonas hydrophila* for the removal of oil and grease from cattle slaughterhouse effluent. **Journal of Cleaner Production**, v. 287, 2021.

HILL, E. C.; HILL, G. C. Strategies for resolving problems caused by microbial growth in terminals and retail sites handling biodiesel., In IASH, 2009, The 11^o International Conference on Stability Handling and Use of Liquid Fuels, Prague, Czech Republic, 2009.

HMIDET, N., JEMIL, N., NASRI, M. Simultaneous production of alkaline amylase and biosurfactant by *Bacillus methylotrophicus* DCS1: application as detergent additive. **Biodegradation**, v. 30, p. 247, 2019.

HUANG, Y., ZHANG, M., WANG, J., XU, D., ZHONG, C. Engineering microbial systems for the production and functionalization of biomaterials. **Current Opinion in Microbiology**, 68:102154, 2022

HUFF, G. M. Identificação molecular e verificação da capacidade proteolítica de bactérias isoladas de lodo de dejetos suínos. **Relatório final de Iniciação Científica**. Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina, 2019.

IRAM, A., CEKMECELIOGLU, D., DEMIRCI, A. Salt and nitrogen amendment and optimization for cellulase and xylanase production using dilute acid hydrolysate of distillers' dried grains with solubles (DDGS) as the feedstock. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, p. 1–14, 2022.

JAKERIA, M. R., FAZAL, M. A., HASEEB, A. S. M. A. Influence of different factors on the stability of biodiesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, p. 154–163, 2014.

JUNKINS, E. N., MCWHIRTER, J. B., MCCALL, LI, STEVENSON, B. S. Environmental structure impacts microbial composition and secondary metabolism. **ISME Communications**, v. 2, n. 15, 2022.

KHADIRI, M., BOUBAKER, H., ASKARNE, L., EZRARI, S., RADOUANE, N., FARHAOUI, A., HAMSS, H. E., TAHIRI, A., BARKA, E. A., LAHLALI, R. *Bacillus cereus* an effective bacterial antagonist against major postharvest fungal pathogens of fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 200, 112315, 2023.

KEBER, S. S. Prospecção de bactérias com potencial na biorremediação de áreas contaminadas com BTX (benzeno, tolueno e xileno). **Dissertação** (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2020.

KOMARIAH, L. N., ARITA, S., RENDANA, M., RAMAYANTI, C., SURIANI, N. L., ERISNA, D. Microbial contamination of diesel-biodiesel blends in storage tank; an analysis of colony morphology. **Heliyon**, v. 8, n. 4, 2022.

KORSA, G., MASI, C.; KONWARH, R., TAFESSE, M. Harnessing the potential use of cellulolytic *Klebsiella oxytoca* (M21WG) and *Klebsiella* sp. (Z6WG) isolated from the guts of termites (Isoptera). **Annals of Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 1–15, 2022.

LINTON, S. M. The structure and function of cellulase (endo- β -1, 4-glucanase) and hemicellulase (β -1, 3-glucanase and endo- β -1, 4-mannase) enzymes in invertebrates that consume materials ranging from microbes, algae to leaf litter. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 240, 110354, 2020.

LISIECKI, P., CHRZANOWSKI, Ł., SZULC, A., ŁAWNICZAK, Ł., BIAŁAS, W., DZIADAS, M., ... & JELEŃ, H. Biodegradation of diesel/biodiesel blends in saturated sand microcosms. **Fuel**, v. 116, p. 321-327, 2014.

LOZADA, J. A. Prospecção de bactérias do lodo de esgoto de abatedouro de aves com potencial degradador de substâncias orgânicas e promotor do crescimento de plantas. **Dissertação de Mestrado**. Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa, 2015.

MANDIC-MULEC I, STEFANIC P, VAN ELSAS JD. Ecology of Bacillaceae. **Microbiol Spectr**, v. 3, n. 2, TBS-0017-2013, 2015.

MARMANN, A., ALY, A. H., LIN, W., WANG, B., PROKSCH, P. Co-cultivation--a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. **Marine Drugs**, v. 12, n.2, p.1043-1065, 2014.

MARTIN-SANCHEZ, P. M., GORBUSHINA, A. A., TOEPEL, J. Quantification of microbial load in diesel storage tanks using culture-and qPCR-based approaches. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 126, p. 216-223, 2016.

MATHEW, C. E., IZOMOR, R. N. Screening for lipase producing bacteria from abattoir soil. **The Bioscientist Journal**, v. 11, n. 1, p. 37-42, 2023.

MEIRA, M., SANTANA, P. M. B., SILVA, D. S., CATARINO, F. B. S., BORGES, L. F. J., & MOREIRA, L. B. Aditivos melhoradores da estabilidade oxidativa e corrosividade do biodiesel e da lubricidade das suas misturas com diesel. **Revista Educação, Tecnologia e Cultura-ETC**, v. 14, n. 14, 2016.

MILLE-LINDBLOM, C., FISCHER, H., TRANVIK, L. J. Antagonism between bacteria and fungi: substrate competition and a possible tradeoff between fungal growth and tolerance towards bacteria. **OIKOS - Advancing Ecology**, v. 113, n. 2, p. 233-242, 2006.

MURAS, A., ROMERO, M., MAYER, C., OTERO, A. Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 609-627, 2021.

NEVES, A. C. Avaliação da radiação ultravioleta na inativação de microrganismos presentes em óleo diesel. **Dissertação**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Energia na Agricultura - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2018.

NEVES, A. C. Influência do teor de biodiesel no processo de degradação microbiana do óleo diesel e utilização de radiação ultravioleta como alternativa ao controle microbiológico. **Tese de doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2023.

NEVES, A. C., POLINARSKI, M. A., ROSADO, F. R., ROSADO, A. F., SILVA, E. A., ALVES, H. J. Effect of ultraviolet radiation on inactivation of microorganisms present in Brazilian diesel fuel. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 14, p. 1152-1162, 2020.

OH, S. Y., HEO, N. S., SHUKLA, S., KANG, S. M., LEE, I., LEE, H., ... & HUH, Y. S. Multi-stress radioactive-tolerant *Exiguobacterium acetylicum* CR1 and its applicability to environmental cesium uptake bioremediation. **Journal of Cleaner Production**, v. 205, p. 281-290, 2018.

ONUORAH, S. C., IKEGBUNAM, M. N., AWAH, S. N., EZEADILA, J. O. Microbial Contamination of Stored Diesel Oil in Nigeria. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n.3, p. 1459-1464, 2013.

PASSMAN, F. J. Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980—a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 88-104, 2013.

PHULPOTO, I. A., YU, Z., BOWEN, H., NDAYISENGA, F., JINMEI, L., LIANG, H., QAZI, M. A. Production and characterization of surfactin-like biosurfactant produced by novel strain *Bacillus nealsonii* S2MT and its potential for oil contaminated soil remediation. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 145, 2020.

POLINARSKI, M. A., NEVES, A. C., FIORINI, A., ROSADO, F. R., SILVA, E. A., ALVES, H. J. Ultraviolet radiation as an antimicrobial treatment in Brazilian diesel oil: Effect of biodiesel, sulfur, and water contents. **Fuel**, n. 308, 2022.

PRAKASHAM, R. S., SUBBA RAO, C., SARMA, P. N. Green gram husk—an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation. **Journal Bioresource Technology**, v. 97, p. 1449-1454, 2006.

PULLEN, J., SAEED, K. An overview of biodiesel oxidation stability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 8, p. 5924-5950, 2012.

RADDADI, N., CROTTI, E., ROLLI, E., MARASCO, R., FAVA, F., DAFFONCHIO, D. **The Most Important *Bacillus* Species in Biotechnology**. In: Sansinenea, E. (eds) *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. Springer, Dordrecht, 2012.

RAMNATH, L., SITHOLE, B., GOVINDEN, R. Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to *Eucalyptus* wood species for application in the pulping industry. **Biotechnology Reports (Amst)**, v. 22, n. 15, p. 114-124, 2017.

RESTREPO-FLÓREZ, J. M., BASSI, A., REHMANN, L., & THOMPSON, M. R. Effect of biodiesel addition on microbial community structure in a simulated fuel storage system. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 456-463, 2013.

REYAD, M. A. Diverse of enzymatically active actinomycetes associated with mangrove Rhizosphere in Jazan coast. **Ann. Biol. Res.**, v. 4, n. 4, p. 100-108, 2013.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E., RODRÍGUEZ, E., BLANCO, R., CORDERO, I., & SEGURA, D. Fungal contamination of stored automobile-fuels in a tropical environment. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 10, p. 1595-1601, 2010.

- SALGADO, B. G. A., GÓMEZ, P. J. H. & RESTREPO-FLORES, C. E. Efecto de la cadena de frío sobre el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, la calidad fisicoquímica y la alteración de jamones cocidos lonchados empacados al vacío. **Revista Lasallista de Investigación**, v. 9, n. 2, 2013.
- SAXENA, A.K.; KUMAR, M.; CHAKDAR, H.; ANUROOPA, N.; BAGYARAJ, D.J. *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. **Journal of Applied Microbiology** v.128, p. 1583–1594, 2019
- SCHOENI, J. L., WONG, A. C. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 3, p. 636-648, 2005.
- SEILER, H., SCHMIDT, V., WENNING, M., SCHERER, S. *Bacillus kochii* sp. nov., isolated from foods and a pharmaceuticals manufacturing site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 62, p. 1092-1097, 2012.
- SETLOW, P., WANG, S., LI, Y-Q. Germination of spores of the orders Bacillales and Clostridiales. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, p. 459–477, 2017.
- SHAHRIAR, M., HAQUE, R., KABIR, S., DEWAN, I, BHUYIAN, M. A. Effect of Proteinase-K on Genomic DNA Extraction from Gram-positive Strains. **Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 53-57, 2011.
- SHARMA, K. M., KUMAR, R., PANWAR, S., KUMAR, A. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 115–126, 2017.
- SHARMA, M., GAT, Y., ARYA, S., KUMAR, V., PANGHAL, A., KUMAR, A. A Review on Microbial Alkaline Protease: An Essential Tool for Various Industrial Approaches. **Journal Industrial Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 69-78, 2019.
- SHINTANI, T., UPADHYAY, S. K. e SINGH, S. P. **An Introduction to Microbial Biodiversity and Bioprospection**. In *Bioprospecting of Microorganism-Based Industrial Molecules* (eds S.P. Singh and S.K. Upadhyay), 2021.
- SIERRA, G. A. simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 23, n. 1, p. 15-22, 1957.
- SILVA, I. J. S. Potencial biotecnológico de espécies dos gêneros *Streptomyces* e *Bacillus* isoladas dos rios Madeira e Purus para aplicação agrícola. **Dissertação de mestrado**. Amazonas: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, 2021.
- SØRENSEN, G., PEDERSEN, D. V., NØRGAARD, A. K., SØRENSEN, K. B., & NYGAARD, S. D. Microbial growth studies in biodiesel blends. **Bioresource technology**, v. 102, n. 8, p. 5259-5264, 2011.
- SORIANO, A. U., MARTINS, L. F., DE ASSUMPCÃO VENTURA, E. S., DE LANDA, F. H. T. G., DE ARAÚJO VALONI, É., FARIA, F. R. D., ... & DO CARMO, F. L. Microbiological aspects of biodiesel and biodiesel/diesel blends biodeterioration. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 99, p. 102-114, 2015.
- STROHL, W. A., ROUSE, H, FISHER, B. D. *Microbiologia Ilustrada*. Porto Alegre: Artmed. 2004. 531 p.
- SUMANTHA, A., LARROCHE, C., & PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: A perspective. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 211–220, 2006

SUN, H., ZHAO, P., GE, X., XIA, Y., HAO, Z., LIU, J., PENG, M. Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 4, p. 988–1003, 2010.

TEATHER, R. N., WOOD, P. J. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. **Applied Environmental Microbiology**, v. 43, p. 777-780, 1982.

THIELE, S. Avaliação preliminar da degradação de celulose por isolados fúngicos do gênero *Macrocybe* coletados na região Noroeste do Estado do Paraná. **Monografia (graduação)** - Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2021.

TORNEY, F., MOELLER, L. SCARPA, A. WANG, K. Genetic engineering approaches to improve bioethanol production from maize. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 193–199, 2007.

VERMA, V., AVASTHI M.S., GUPTA, A.R., SINGH, M. KUSHWAHA, A. Amylase production and purification from bacteria isolated from a waste potato dumpsite in district Farrukhabad U.P state India. **European Journal of Experimental Biology**, v. 1, n. 3, p. 107–113, 2012.

WHITE, J., GILBERT, J., HILL, G., HILL, E., HUSE, S. M., WEIGHTMAN, A. J., & MAHENTHIRALINGAM, E. Culture-independent analysis of bacterial fuel contamination provides insight into the level of concordance with the standard industry practice of aerobic cultivation. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4527-4538, 2011.

WILSON, D. B. Cellulases and biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 295–299, 2009.

WOLDEMARIAMYOHANNES, K., WAN, Z., YU, Q., LI, H., WEI, X., LIU, Y., WANG, J., SUN B. Prebiotic, Probiotic, Antimicrobial, and Functional Food Applications of *Bacillus amyloliquefaciens*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 50, 2020.

ZHANG, X, AL-DOSSARY, A, HUSSAIN, M, SETLOW, P, LI, J. Applications of *Bacillus subtilis* Spores in Biotechnology and Advanced Materials. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 17, 2020.