

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL E
BIOPROCESSOS

**COMUNIDADES BACTERIANAS TERMOFÍLICAS DE UM VULCÃO ANTÁRTICO:
POTENCIAIS PARA BIOPROSPECÇÃO**

JÚNIA SCHULTZ

RIO DE JANEIRO
2019

JÚNIA SCHULTZ



Comunidades bacterianas termofílicas de um vulcão Antártico:
Potenciais para bioprospecção



Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos.

Orientador: Prof. Alexandre Soares Rosado, Dr.

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

S387c Schultz, Júnia
Comunidades bacterianas termofílicas de um vulcão
Antártico : Potenciais para bioprospecção / Júnia
Schultz. -- Rio de Janeiro, 2019.
228 f.

Orientador: Alexandre Soares Rosado.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Decania do Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal,
2019.

1. Termofílicos. 2. Ambientes extremos. 3.
Antártica. 4. Bioprospecção. 5. Indústria
petrolífera. I. Soares Rosado, Alexandre, orient.
II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

FOLHA DE APROVAÇÃO



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde

Coordenação de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal
e Bioprocessos

ATA DO EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE JÚNIA SCHULTZ, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS (BIOTECNOLOGIA VEGETAL E BIOPROCESSOS).

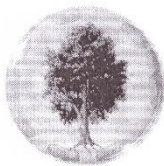
Aos onze dias do mês de outubro ano de dois mil e dezenove, às 13 horas, reuniu-se no Anfiteatro do Instituto de Microbiologia, Bloco I do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, a Banca Examinadora abaixo discriminada, para avaliação da Tese de Doutorado da aluna **Júnia Schultz**, intitulada: "Comunidades bacterianas termofílicas de um vulcão Antártico. Potenciais para bioprospecção" desenvolvida sob a orientação do **Dr. Alexandre Soares Rosado**. A apresentação feita pela candidata e foi acompanhada da arguição pelos componentes da Banca. Em seguida, esta se reuniu para sua avaliação e a tese foi (A) (inserir letra apropriada).

- A) Aprovado;
- B) Aprovado com pequenas modificações* a serem combinadas com o Presidente da Banca dentro de um mês;
- C) Não aprovado ainda, é necessária a apresentação das modificações/correções* em uma nova versão do documento para o Presidente da Banca e uma carta do Presidente com prazo de máximo 3 meses para ser aprovada; se não reprovada
- D) Não aprovado ainda, é necessária uma nova apresentação*, oral e escrita, para a mesma ou nova banca examinadora dentro de um prazo combinado com a comissão do Programa.
- E) Reprovado, razões da reprovação* escritas no espaço destinado.

*As modificações/correções/razões para reprovação precisam ser discriminadas e o Presidente da Banca e o(a) aluno(a) precisam estar cientes.

E, para constar, foi lavrada a presente ata que vai devidamente assinada pelo coordenador, pelos membros da Comissão Examinadora e pela orientadora do aluno. A aluna deve ficar com uma cópia da ata e a outra deve ser entregue para a secretaria do PBV pelo Presidente da Banca.


Rio de Janeiro, 11 de outubro de 2019.



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde

Coordenação de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal
e Bioprocessos

ATA DO EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE JÚNIA SCHULTZ, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS (BIOTECNOLOGIA VEGETAL E BIOPROCESSOS).

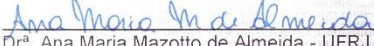

Dr. Andrew Macrae – Coordenador

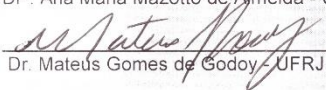
**Andrew Macrae**
Coord. do Curso de Pós-Graduação
Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos
PBV - DECANIA / CCS
SIAPE: 2320726

Dr^a. Alane Beatriz Vermelho – UFRJ

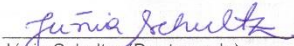

Dr^a. Fernanda de Ávila Abreu - UFRJ


Dr. Marcio Alves Ferreira - UFRJ


Dr^a. Ana Maria Mazotto de Almeida - UFRJ


Dr. Mateus Gomes de Godoy - UFRJ

Dr. Alexandre Soares Rosado (Orientador)


Júnia Schultz (Doutoranda)

LISTA DE MODIFICAÇÕES, CORREÇÕES OU RAZÕES PARA REPROVAÇÕES:

Ciente,


Presidente da Banca

Ciente,


Aluno(a)

Centro de Ciências da Saúde – Bloco K
Sala K2-032 – 2º andar – Cidade Universitária
CEP: 21941-590 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil
Tel: 3938-6676 - E-mail: pbv@ccsdecania.ufrj.br

*“You gave me wings and made me fly
You touched my hand I could touch the sky
I lost my faith, you gave it back to me
You said no star was out of reach.”*

Aos meus pais, Rosi e Valdemar,
dedico mais essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Na realização de um trabalho científico como este, se faz necessário a colaboração de pessoas e instituições para o bom desenvolvimento do mesmo, desde o projeto até o trabalho final. Assim como a participação ativa da família e amigos, que contribuíram de forma essencial para seguir em frente e atingir com êxito os objetivos estabelecidos. Dessa maneira, torna-se fundamental, menos por praxe e mais por reconhecimento autêntico, agradecer a elas. Em especial, quero expressar meus sinceros agradecimentos:

Ao povo brasileiro, que com muita dificuldade financia a ciência em nosso país;

Aos meus pais, Rosi e Valdemar, por todo o amor e dedicação incondicional para a minha educação desde os meus primeiros anos de vida. Obrigada por estarem sempre ao meu lado me incentivando, acreditando no meu potencial, financiando meus sonhos e vibrando a cada conquista. Sem vocês, nada teria sido possível! O suporte de vocês foi essencial para que eu pudesse ir mais longe! Também, ao meu irmão Wellington, por ser sempre tão generoso e singular, por transmitir amor, amizade e apoio à distância e à sua maneira. Amo vocês;

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, que foi meu lar científico por quatro anos. Obrigada pela oportunidade e formação;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Soares Rosado, a quem eu sou muito grata por tudo o que aconteceu ao longo do Doutorado. Alguém a quem se inspirar e espelhar para construir uma carreira sólida, de muitas colaborações internacionais e nacionais, e de sempre estar com a cabeça e portas abertas para novos desafios. Obrigada por ter aceito alguém do interior de Santa Catarina, que queria explorar novos caminhos na Microbiologia Ambiental e que se realizou ao encontrar na área de Ambientes extremos a sua paixão; por despertar o desejo de romper fronteiras do conhecimento e oceanos; por todas as oportunidades e portas que você abriu para mim; por seu tempo, carinho, confiança, respeito. Se hoje defendo esse trabalho, que ambos sabemos que não foi fácil de finalizá-lo, com várias mudanças de projeto e

percalços no caminho, foi porque tive seu apoio em todas as etapas. Obrigada por não cortar minhas asas, por me deixar segura e me fazer acreditar que posso voar mais longe;

À querida Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos da UFRJ, especialmente aos coordenadores Andrew e Fernanda, por acreditarem em mim e no meu potencial. Sei que deve ter sido difícil no começo, não sabendo nada de mim e mesmo assim deram o voto de confiança. Espero que após esses 4 anos de caminhada eu tenha trazido orgulho a vocês. Às secretárias Natalle e Tayline, muito obrigada por toda ajuda; sempre pude contar com a paciência e suporte de vocês, principalmente quando eu estava há milhares de quilômetros longe do Rio de Janeiro;

Aos órgãos de fomento que financiaram minha pesquisa, bem como forneceram bolsa de estudos durante os quatro anos de Doutorado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Doutorado concedida por 3 anos e 3 meses, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior por 6 meses;

Ao Programa Antártico Brasileiro, ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Marinha do Brasil e à Força Aérea Brasileira, pelo apoio financeiro e logístico durante as Operações Antárticas para coleta de material utilizado no presente trabalho;

À Academia de Ciências da Austrália, Embaixada da Austrália no Brasil e Embaixada do Brasil na Austrália pela oportunidade de intercâmbio por 2 meses em uma das melhores universidades do mundo: University of Queensland, em Brisbane. Muitos contatos e dados foram gerados com essa conexão, mas principalmente, me deu coragem para enfrentar o mundo e ver que eu era capaz, seja profissionalmente de aplicar meu projeto para outras oportunidades internacionais e de utilizar uma língua não nativa, seja pessoalmente, de que eu podia morar do outro lado do mundo e ficar bem e ser feliz. Also, a special thanks to Dr. Paul Dennis and Dr. Anil

Raghavendra, for receiving so well and for all the assistance during my internship. It was a great time at Dennis' Lab, where I could improve my knowledge in molecular biology techniques;

À Université de Bretagne Occidentale (UBO), na França, pela oportunidade de mobilidade internacional. Que essa primeira parceria entre as universidades brasileira e francesa continue rendendo publicações e novas colaborações. Thank you, Prof. Dr. Mohamed Jebbar, for the opportunity and for chosen me to be a receipt of this award;

Ao Instituto de Pesquisas Helmholtz, que aceitou me receber por 6 meses para o desenvolvimento do meu doutorado sanduíche e que durante esse tempo me abriu portas de todos os pesquisadores e laboratórios. Também me mostrou como é produtivo se trabalhar num instituto de pesquisas e que é possível ter um ambiente de trabalho não competitivo, com generosidade e empatia. Many thanks to Dr. Ulisses Nunes da Rocha, João, René, Felipe, Lummy, N'afiu, Rodolfo and Nicole for all your assistance in 6 months working together. I learned so much and I could have a great time of my professional life with you. Also, a special thanks to Lummy... You know how important you were in my time in Germany and when I came back to Brazil! I am very grateful to have you in my professional and personal life!

Ao Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade de São Paulo, em especial à Prof. Vivian H. Pellizari e Amanda Gonçalves Bendia, por cederem os dados metagenômicos e por coletarem sedimento da Ilha Deception durante o Doutorado por meio do projeto Microsfera/CNPq. Essa parceria foi fundamental para a realização desse estudo, frente à crise e falta de verba para pesquisa que assolou o País durante os quatro anos de Doutorado;

Aos meus professores da graduação e mestrado que tanto me inspiraram e me guiaram na carreira científica, especialmente Prof. Sidney Stürmer, Prof. Keila Zaniboni Siqueira Batista, Prof. Adilson Pinheiro e Prof. Joel Dias da Silva. Suas trajetórias acadêmica e profissional serviram de modelo e inspiração para que eu estabelecesse a minha, e seus ensinamentos foram essenciais para um

direcionamento da minha profissão. Muito obrigada por me acompanharem até hoje e estarem sempre dispostos a me ajudar;

Aos melhores amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular (LEMM), Érika, Denise, Helena, Caren, Juliana, Phillipe e Flávio, aos demais colegas de trabalho, técnicos Marcos e Edir, e também à coordenadora e cientista inspiradora, Prof. Raquel Peixoto. Foi um prazer compartilhar esses anos com vocês em terras cariocas e num mundo novo de biologia molecular, bioinformática e microbiologia de petróleo. Vocês foram imprescindíveis para meu aprimoramento na microbiologia e estiveram sempre presentes em todas as etapas de crescimento profissional e pessoal. Agradeço também aos que passaram pelo "Extremophiles team" pela parceria nas pesquisas com microbiologia de ambientes extremos, em especial à minha ex-bolsista de iniciação científica e co-orientada de trabalho de conclusão de curso Isabella Campelo Vilardi Argentino, pelo auxílio no laboratório e experimentos, e por iluminar o dia com sua presença e alegria contagiante;

Aos meus amigos catarinenses que sempre estão ao meu lado para qualquer momento, especialmente aqueles difíceis e estressantes que se enfrenta na pós-graduação. Obrigada Mônica, Andreza, Deise, Jaqueline, Diego e Karl por serem os melhores amigos e por terem os melhores abraços acolhedores e palavras mais reconfortantes. Mesmo à distância sei que se importam comigo e querem me ver alcançar o mundo cada vez mais;

Aos amigos que fiz ao longo das diferentes moradias que tive no Doutorado. Elaine e Polyana, obrigada por compartilharem o cotidiano, as frustrações, os medos, as alegrias e por ficarem felizes a cada conquista minha. Vocês fizeram eu me sentir em casa no Rio de Janeiro. To all my friends that I made in Australia: Kate, Kenneth, Anil, Karen, Philip, Liliane, Ana Paula, Maria Clara and Leiliane. You were my safe place in the other side of the world. Special thanks to my friends in France: Blandine, Marc, Clarisse, Florian, Jordan, Barbara and Sarah. I shared my sunny and cloudy days with you, and you guys helped me in a way that I never will be able to recompensate. To all my amazing friends in Germany: Christopher, Sebastian, Mayara, Ruan, Juliana, Gabriela, Joyce, Laszlon, Lummy, Bruna, Tobias, Natalia,

Adriana, Krupa, Xin, Francesco, Fernando, Bijing, Swamini, Teodoro and Judith. If my days in Germany were the best days of my life, it was because I had you guys participating of these incredible months;

A revisora da tese e a todos os membros da minha banca por terem aceitado o convite de fazer parte da etapa mais importante da minha formação. Obrigada por aceitarem com tanta boa vontade esta responsabilidade;

Por fim, um agradecimento especial a mim mesma por acreditar em mim e na minha capacidade; por tentar acertar mais do que errar; por perseverar frente ao caos dos últimos meses do Doutorado; criar oportunidades, manejar o tempo sabiamente para conseguir aproveitar ao máximo o que o Doutorado poderia oferecer; correr atrás para alcançar minhas metas – mesmo que fosse longe da família, amigos, País e da zona de conforto; de me adaptar à novas cidades, países, línguas e rotinas; e enfrentar períodos de muita tensão e estresse (que não foram poucos!), mas que graças a todo o suporte dos descritos acima, eu nunca pensei em desistir!

A todos que me inspiraram, incentivaram e auxiliaram, o meu muito obrigada por fazerem parte dos quatro anos mais importantes e incríveis da minha vida.

*“It matters not how strait the gate,
How charged with punishments the scroll
I am the master of my fate:
I am the captain of my soul.”*

Invictus, William Ernest Henley

RESUMO

SCHULTZ, Júnia. Comunidades bacterianas termofílicas de um vulcão Antártico: Potenciais para bioprospecção. Rio de Janeiro, 2019. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos) – Decania do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

O continente Antártico é caracterizado por ser um mosaico de extremos, apresentando diferentes ecossistemas, predominantemente gelados. Entretanto, a Antártica possui quatro vulcões ativos, entre eles, a Ilha Deception, um estratovulcão que emite gases fumarólicos, no qual a temperatura alcança mais de 100 °C e apresenta influência marinha. Estas características fornecem condições ideais para selecionar uma variedade de microrganismos, entre eles termofílicos, que apresentam diferentes funções no ambiente extremo e adaptações metabólicas versáteis e únicas. Por meio de métodos dependentes e independentes de cultivo, é possível explorar o potencial da comunidade microbiana termofílica como candidatos à aplicação biotecnológica em diferentes áreas, como na indústria do petróleo. Dessa maneira, amostras de sedimentos associados a fumarolas de dois ambientes geotermiais da Ilha Deception com temperaturas variando de 0 a 100°C, foram coletadas e submetidas à técnicas dependentes e independentes de cultivo, com o intuito de avaliar a comunidade bacteriana termofílica e verificar seu potencial metabólico para degradação de hidrocarbonetos de petróleo e produção de biossurfactante. O objetivo foi bioprospectar microrganismos e/ou seus metabólitos aplicáveis em processos de biorremediação e recuperação avançada do óleo. Adicionalmente, verificou-se o cenário atual da bioprospecção de ambientes extremos e de bioprodutos de extremofílicos para aplicação biotecnológica em diferentes áreas industriais por meio de um levantamento bibliográfico. Os resultados do levantamento mostraram que microrganismos presentes em ambientes extremos são fonte de produtos com grande potencial biotecnológico, devido às características fisiológicas e adaptadas a condições extremas. Os bioprodutos, como os biossurfactantes, são muito visados para aplicação em indústrias farmacêutica, alimentícia, produção de biocombustível e, principalmente, na indústria petrolífera. Dessa maneira, se faz necessário a busca por ambientes subexplorados para novos bioprodutos e aplicações. Para o perfil taxonômico dos metagenomas, foi observada a abundância dos Filos Bacteroidetes e Proteobacteria nas amostras com temperatura ambiental inferior a 80°C, e de Firmicutes nas amostras de fumarola com temperatura de 9 °C. No cultivo bacteriano a 55°C, houve o isolamento apenas de representantes do Filo Firmicutes, pertencentes aos gêneros *Geobacillus*, *Brevibacillus*, *Anoxybacillus* e *Atopococcus*, em todas as amostras. Isso indica que houve a recuperação de estirpes no isolamento que não são dominantes nos ambientes geotermiais, uma vez que na análise metagenômica se detecta, em sua grande maioria, os grupos que estão abundantes devido ao limite de detecção desse tipo de sequenciamento. Quanto ao perfil funcional, observou-se a prevalência da degradação anaeróbica e de 32 vias metabólicas diferentes para a degradação de compostos aromáticos. Também foi detectado as principais vias de degradação de compostos aromáticos e de enzimas-chave no processo, indicando o potencial metabólico positivo para degradação pela comunidade microbiana existente. Na bioprospecção por bactérias capazes de degradarem hidrocarbonetos de petróleo e produzirem biossurfactante, foi possível

verificar que de 100 estirpes termofílicas de Deception, 81 cresceram em meio de cultura suplementado com óleo cru e 25 apresentaram os melhores resultados no teste de degradação. No *screening* para produção de biossurfactante utilizando diferentes métodos, verificou-se que dentre as 50 estirpes testadas, 14 mostraram índice de emulsificação >50% de óleo cru e/ou diesel, estabilidade da emulsificação a 100°C e positivos para os testes de deslocamento da gota, colapso da gota e atividade hemolítica. Destes, 11 estirpes foram isoladas de Fumarole Bay e 3 de Whalers Bay. O índice de emulsificação e a estabilidade da emulsificação apresentaram os melhores resultados com óleo cru. De modo geral, 4 estirpes apresentaram os resultados mais promissores para degradação de óleo e produção de biossurfactante: FB2_38 (*Atopococcus*), FB3_54 (*Geobacillus*), FB4_88 (*Geobacillus*) e WB1_122 (*Anoxybacillus*). Dois isolados tiveram seu genoma completo sequenciado e verificou-se que ambos tiveram anotação para genes relacionados à degradação de compostos aromáticos, como fluoreno, naftaleno, antraceno, tolueno e xileno, assim como para metabólitos secundários, como terpenos, bacteriocinas, fengicina e ectoína; e nenhum gene de resistência foi observado. Em conjunto, os resultados encontrados no presente estudo forneceram dados inéditos do potencial metabólico da comunidade bacteriana termofílica da Ilha Deception e representam os primeiros avanços para a exploração da capacidade de degradação de hidrocarbonetos de petróleo e produção de biossurfactantes do vulcão antártico Deception.

Palavras-chave: Antártica; Ambiente geotermal; Extremofílicos; Degradação de hidrocarbonetos de petróleo; Biossurfactante; Bioprospecção.

ABSTRACT

SCHULTZ, Júnia. Comunidades bacterianas termofílicas de um vulcão Antártico: Potenciais para bioprospecção. Rio de Janeiro, 2019. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos) – Decania do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

The Antarctic continent is characterized by being a mosaic of extremes, presenting different ecosystems, predominantly cold. However, Antarctica harbours four active volcanoes, including Deception Island, a stratovolcano that emits fumarolic gases, with temperature reaching over 100°C and present marine influence. These characteristics provide ideal conditions for selecting a variety of microorganisms, including thermophiles that show different extreme environment functions and also, unique and versatile metabolic adaptations. Through dependent and independent cultivation methods, it is possible to explore the potential of the thermophilic microbial community as candidates for biotechnological application in different areas, such as in oil industry. In this way, samples of sediments associated with fumaroles from two geothermal environments of Deception Island, with temperatures ranging from 0 to 100 °C, were collected and performed dependent and independent cultivation techniques, in order to evaluate the thermophilic bacterial community and verify its metabolic potential for petroleum hydrocarbon degradation and biosurfactant production. The objective was to bioprospect microorganisms and/or their applicable metabolites in bioremediation and advanced oil recovery processes. Additionally, the current scenario of extreme environment bioprospecting and extremophilic bioproducts for biotechnological application in different industrial areas was verified through a bibliographic survey. The survey results showed that microorganisms present in extreme environments are a source of products with great biotechnological potential, due to physiological characteristics and adaptations to extreme conditions. Bioproducts, such as biosurfactants, are widely targeted for application in the pharmaceutical, food, biofuel production and especially in the oil industry. Thus, it is necessary to search for underexplored environments for new bioproducts and applications. For the taxonomic profile of Deception Island metagenomes, it was observed the abundance of Bacteroidetes and Proteobacteria phyla in samples with ambient temperature below 80°C, and Firmicutes in fumarole samples with temperature of 98°C. In the bacterial culture at 55°C, only representatives of the Firmicutes phylum, belonging to the genera *Geobacillus*, *Brevibacillus*, *Anoxybacillus* and *Atopococcus*, were isolated in all samples. This indicates that there was recovery of strains in isolation that are not dominant in geothermal environments, since in the metagenomic analysis most of the groups are abundant due to the limit of detection of this type of sequencing. Regarding the functional profile, it was observed the prevalence of anaerobic degradation for degradation of aromatic compounds and 32 different metabolic pathways related. The main degradation pathways of aromatic compounds and key enzymes in the process were also detected, indicating the positive metabolic potential for degradation by the microbial community. In the screening for bacteria capable of degrading petroleum hydrocarbons and producing biosurfactant, it was possible to verify that from 100 thermophilic strains of Deception, 81 grew in culture medium supplemented with crude oil and 25 strains showed the best results in the degradation test. In the screening for biosurfactant production using different methods, it was found that among the 50

strains tested, 14 showed emulsification index >50% in crude oil and/or diesel, emulsification stability at 100 °C and positive for the oil displacement test, oil drop collapse and hemolytic activity. Of these, 11 strains were isolated from Fumarole Bay and 3 from Whalers Bay. Emulsification index and emulsification stability showed the best results with crude oil as carbon source. Overall, 4 strains showed the most promising results for oil degradation and biosurfactant production: FB2_38 (*Atopococcus*), FB3_54 (*Geobacillus*), FB4_88 (*Geobacillus*) and WB1_122 (*Anoxybacillus*). Two isolates had their complete genome sequenced and both were annotated for genes related to the degradation of aromatic compounds, such as fluorene, naphthalene, anthracene, toluene and xylene, as well as for secondary metabolites, such as terpenes, bacteriocins, fengicin and ectoin; and no resistance genes were observed. Taken together, the results found in the present study provided unpublished data on the metabolic potential of Deception Island's thermophilic bacterial community and represent the first advances in exploring the degradation capacity of petroleum hydrocarbons and biosurfactant production in the Antarctic volcano Deception Island.

Keywords: Antarctica; Geothermal environment; Extremophiles; Petroleum hydrocarbons degradation; Biosurfactant; Bioprospection.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** a) Localização e limites da Região Antártica, onde FPA representa a posição média da Zona da Frente Polar Antártica; b) Principais topônimos Antárticos.....1
- Figura 2** Continente Antártico e ecossistemas encontrados ao longo do continente e na Península da Antártica: a) ambiente orgânico e com crescimento vegetal, b) ambiente ornitogênico, c) vale seco, d) vulcão polar, e) fumarolas marinhas de profundidade e f) geleiras.....3
- Figura 3** a) Distribuição dos vulcões ativos (verdes) e inativos (vermelho) presentes em Victoria Land, no continente e na Península Antártica, bem como as placas tectônicas responsáveis pela atividade geotermal; b) Imagem do vulcão Monte Erebus; c) Imagem do vulcão Monte Melbourne; d) Imagem do vulcão Monte Rittman; e) Imagem da ilha vulcânica Ilha Deception.....5
- Figura 4** Arquipélago Ilhas Shetland do Sul, Península Antártica, com destaque para Ilha Deception.....6
- Figura 5** Mapa topográfico da Ilha Deception com os principais pontos geotérmicos (*) e estações de pesquisa: Estações da Argentina (a) e da Espanha (b).....7
- Figura 6** a) Classificação dos extremofílicos quanto aos parâmetros físico-químicos ambientais necessários para seu crescimento ideal; b) Árvore filogenética dos extremofílicos e suas resistências.....10
- Figura 7** Linha do tempo com todas as pesquisas publicadas na área de microbiologia com amostras provenientes da Ilha Deception, iniciando na década de 1970 até a presente data.....14
- Figura 8** Processo de biorremediação e estratégias de bioaumento (adição de microrganismos com capacidades de degradação do contaminante), bioestímulo (adição de nutrientes) e adição de biossurfactante para facilitar/acelerar a degradação do contaminante pelos microrganismos.....20
- Figura 9** Ilustração da atividade do biossurfactante em um ambiente contaminado por petróleo (a), formando micelas (b) após saturação da superfície e resultando na facilitação da ação degradadora por bactérias degradadoras do contaminante.....22
- Figura 10** a) Degradação de hidrocarbonetos alifáticos por ação da monoxigenase ladA encontrada em termofílicos; b) Vias de degradação de fenol por termofílicos, apenas por meta-clivagem; c) Vias de biodegradação do fenantreno e vias de biodegradação do antraceno por bactérias termofílicas.....29
- Figura 11** Recuperação melhorada do óleo em reservatórios através da aplicação de microrganismos e/ou biossurfactantes. Os microrganismos degradam óleo cru de elevado peso molecular em menor peso molecular; os biossurfactantes reduzem a

tensão superficial entre o óleo e a rocha, e entre óleo e água, favorecendo a movimentação do óleo nos poros do reservatório.....31

Figura 12 Fluxograma flexível do MetaWRAP para análise de dados metagenômicos.....38

Figura 13 Representação esquemática das metodologias empregadas para a busca por microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo e produzir biossurfactante.....40

Figura 14 Fluxograma simplificado da metodologia utilizada no estudo.....45

Figura 15 Esquema do continente antártico (A), enfatizando a Península Antártica (B), Ilhas Shetland do Sul (C) e Ilha Deception (D), bem como indicando os pontos de amostragem Em Whalers Bay (E) e Fumarole Bay (F).....46

Figura 16 Exemplo de placa do teste da gota mostrando culturas testadas individualmente em triplicata; a) Controle negativo, sem inóculo bacteriano; b) Controle positivo para degradação.....53

Figura 17 Ilustração dos resultados negativo (A) e positivo (B) no teste de deslocamento do óleo.....55

Figura 18 Ilustração dos resultados positivo (a) e negativo (b) no teste de emulsificação.....56

Figura 19 Visão geral do software MATAM, apresentando as principais etapas do pipeline (esquerda) e ilustração das etapas quando a amostra possui duas espécies (direita).....62

Figura 20 Resultados do sequenciamento do metagenoma *shotgun* pela plataforma Illumina HiSeq quanto ao número de *reads* totais obtidos e número de *reads* após os filtros de qualidade.....147

Figura 21 Número de *hits* para os Domínios detectados na classificação taxonômica com o banco de dados do M5NR, pelo MG-RAST.....148

Figura 22 Filos bacterianos dos sedimentos da Ilha Deception classificados através banco de dados do M5NR, disponível no MG-RAST, exibidos em *Heatmap*.....149

Figura 23 Identificação a nível de Filo dos genomas reconstruídos a partir dos metagenomas (MAGs) da Ilha Deception, Antártica.....152

Figura 24 Perfis funcionais das comunidades microbianas de Deception, classificadas em nível I do SEED *Subsystem*, disponível no MG-RAST e exibidos em *Heatmap*...155

Figura 25 Número de genes presentes para o metabolismo de compostos aromáticos (nível I do SEED <i>subsystem</i>).....	156
Figura 26 Abundância relativa para as sequências vinculadas ao nível II do SEED <i>subsystem</i> do metabolismo de degradação de compostos aromáticos.....	157
Figura 27 Abundância relativa da anotação funcional para os genes vinculados ao nível III do SEED <i>subsystem</i> do metabolismo de degradação de compostos aromáticos.....	159

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 Relação das amostras coletadas em diferentes locais da Península Antártica	47
Quadro 1 Meios de cultura utilizados e a descrição e quantidade dos componentes..	48
Tabela 2 Composição do meio mineral Bushnell-Haas (BH) e do óleo cru (petróleo Marlim P-47).....	52
Tabela 3 Identificação dos genomas reconstruídos a partir dos metagenomas (MAGs) da Ilha Deception, Antártica, por GTDB (<i>Genome Taxonomy Database</i>).....	150

LISTA DE ABREVIações

BH: Bushnell-Haas

BSA: Albumina de soro bovino

DAS Tool: Dereplication, Aggregation and Scoring Tool

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis / Eletroforese em gel com gradiente de temperatura

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTPs: Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

EC: Enzyme Commission number

EOR: Enhanced Oil Recovery / Recuperação avançada de óleo

E24: Teste de emulsificação em 24 horas

FB: Fumarole Bay

FPA: Frente Polar Antártica

gdw: Gram Dry Weight / Peso seco

GTDB: Genome Taxonomy Database

GYM: Glucose Yeast Malt

HPA: Hidrocarbonetos poliaromáticos

HS: High Sensitivity

IE: Índice de Emulsificação

ITS: Internal Transcribed Spacer

LB: Lysogeny Broth

MA: Marine Agar

MAG: Metagenome-assembled genome(s)

MATAM: Mapping-Assisted Targeted-Assembly for Metagenomics

MEOR: Microbial Enhanced Oil Recovery / Recuperação avançada do óleo

MG-RAST: Metagenomics Rapid Annotation using Subsystem Technology

M5NR: Non-redundant protein database

NBRIP: National Botanical Research Institute's phosphate

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NGS: Next Generation Sequencing

OPERANTAR: Operação Antártica

OTUs: Unidades taxonômicas operacionais

pb: Pares de base

PCR: Polymerase Chain Reaction

PGAP: Prokaryotic Genome Annotation Pipeline

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

RAST: Rapid Annotation using Subsystem Technology

RNA: Ácido ribonucleico

RNAr: Ácido ribonucleico ribossomal

rpm: Rotação por minuto

rrs: Gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SRA: Sequence Read Archive

TBE: Tris/Borato/EDTA

T-RFLP: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

UV: Ultravioleta

V: Volts

v: Volume

WB: Whalers Bay

WGS: Whole Genome Sequencing

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	CONTINENTE ANTÁRTICO	1
1.2	AMBIENTES GEOTERMAIS ANTÁRTICOS.....	3
1.2.1	Ilha Deception e suas condições termofílicas	6
1.3	MICROBIOLOGIA EXTREMÓFILA DA ANTÁRTICA.....	9
1.3.1	Microbiologia do vulcão antártico Ilha Deception	12
1.4	POTENCIAL DE BIOPROSPECÇÃO DE TERMOFÍLICOS ANTÁRTICOS	17
1.4.1	Biorremediação de ambientes Antárticos contaminados por petróleo	19
1.4.1.1	<i>Contaminação ambiental e biorremediação na Antártica</i>	22
1.4.1.2	<i>Degradação microbiana de hidrocarbonetos de petróleo na Antártica e ambientes geotermais</i>	25
1.4.2	Recuperação avançada do óleo por microrganismos (MEOR)	30
1.5	METODOLOGIAS DEPENDENTES E INDEPENDENTES DE CULTIVO: FERRAMENTAS PARA BIOPROSPECÇÃO	33
1.5.1	Bioprospecção baseada no cultivo	33
1.5.1.1	<i>Sequenciamento de genoma completo</i>	34
1.5.2	Bioprospecção baseada nas técnicas independentes de cultivo	35
1.5.2.1	<i>Sequenciamento shotgun</i>	36
2	JUSTIFICATIVA	41
3	OBJETIVOS	43
3.1	OBJETIVO GERAL	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM.....	45
4.2	CULTURA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS TERMOFÍLICAS ANTÁRTICAS.....	48
4.2.1	Identificação molecular dos isolados Antárticos	50
4.2.1.1	<i>Análises das sequências</i>	51
4.3	SCREENING POR BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO E PRODUTORAS DE BIODISSURFACTANTE	51
4.3.1	Screening de bactérias degradadoras de petróleo	51

4.3.2 Screening de bactérias termofílicas produtoras de biossurfactante.....	53
4.3.2.1 Teste da produção de espuma.....	54
4.3.2.2 Teste da hemólise.....	54
4.3.2.3 Teste do colapso da gota.....	54
4.3.2.4 Teste do deslocamento do óleo.....	55
4.3.2.5 Teste da emulsificação (E24).....	55
4.3.2.6 Teste da estabilidade do biossurfactante a alta temperatura.....	56
4.4 ANÁLISES GENÔMICAS DE BACTÉRIAS TERMOFÍLICAS DA ANTÁRTICA ..	56
4.5 ANÁLISE METAGENÔMICA DE AMBIENTES GEOTERMAIS DA ANTÁRTICA	58
4.5.1 Obtenção de sequências	58
4.5.1.1 Extração de DNA total das amostras da Ilha Deception.....	58
4.5.1.2 Sequenciamento metagenômico Shotgun.....	59
4.5.2 Análise taxonômica.....	59
4.5.2.1 Processamento, qualidade e montagem dos reads metagenômicos da Ilha Deception.....	59
4.5.2.2 Recuperação de genomas montados a partir dos metagenoma (MAGs) e atribuição de taxonomia.....	60
4.5.3 Análise taxonômica e funcional dos metagenomas da Ilha Deception pelo servidor online MG-RAST.....	60
4.5.4 Recuperação do gene RNAr 16S dos metagenomas da Ilha Deception....	61
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 CAPÍTULO I	64
5.2 CAPÍTULO II	99
5.3 CAPÍTULO III	138
5.4 CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO DA ANÁLISE METAGENÔMICA.....	146
5.4.1 Resultados gerais do sequenciamento <i>Shotgun</i> da Ilha Deception.....	146
5.4.2 Análise taxonômica dos metagenomas da Ilha Deception.....	147
5.4.3 Análise funcional dos metagenomas da Ilha Deception.....	154
5.4.4 Considerações.....	162
6 CONCLUSÃO GERAL.....	164
7 PERSPECTIVAS.....	167
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	169

9 ANEXOS	188
9.1 ARTIGOS E CAPÍTULOS DE LIVRO PUBLICADOS/ACEITOS DURANTE O DOUTORADO.....	188
9.2 PRODUTIVIDADE ACADÊMICA DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO...	198
9.2.1 Produções em qualidade de primeira autora referentes à tese de doutorado.....	198
9.2.2 Produções não relacionadas à tese.....	199
9.2.3 Prêmios e bolsas recebidas	200
9.2.4 Apresentações e participações em eventos científicos	201
9.2.5 Co-orientações e participação de banca.....	202
9.3.6 Outras atividades	203

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTINENTE ANTÁRTICO

A região Antártica (Figura 1a) é composta pelo continente Antártico e ilhas adjacentes, além do oceano Austral que a circunda e auxilia no seu isolamento geográfico, totalizando 13,6 milhões de km². Esta região pode ser dividida em duas zonas (Figura 1b), com base em características climáticas e bióticas. Na primeira zona estão inseridas a Antártica Marítima, que inclui as Ilhas Sandwich do Sul, Bouvetoya, Orkney do Sul, Shetland do Sul, bem como o lado ocidental da Península Antártica; a segunda compreende a Antártica Continental, estando incluídas neste o lado oriental da Península Antártica e o restante do continente (PEAT et al., 2007).

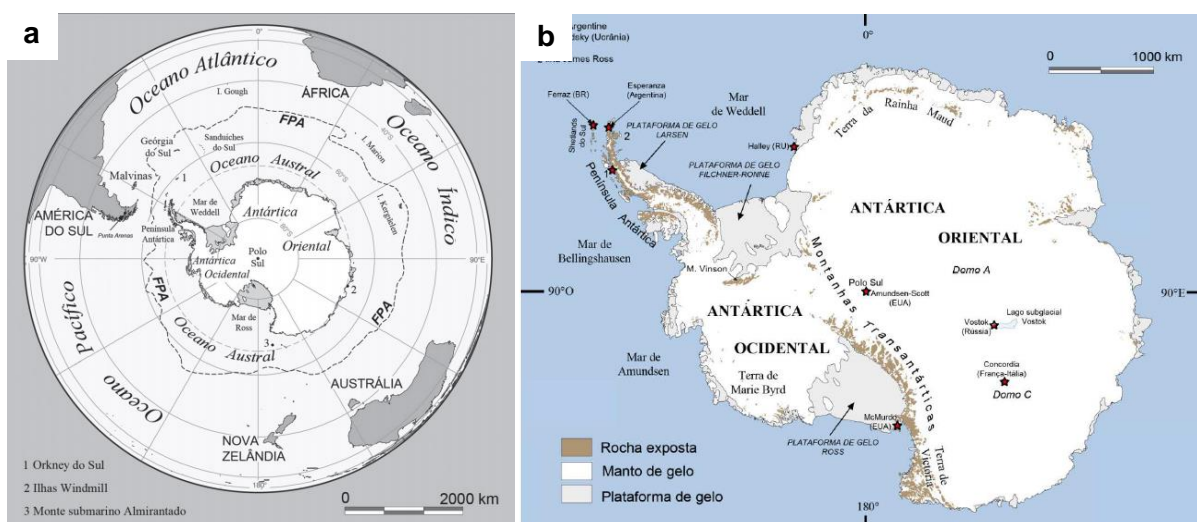


Figura 1. a) Localização e limites da Região Antártica, no qual FPA representa a posição média da Zona da Frente Polar Antártica; b) Principais topônimos Antárticos. Fonte: Simões (2011).

Regiões polares, como o Ártico e Antártica desenvolvem um papel essencial na manutenção da vida no planeta, pois as baixas temperaturas, que são atributos dessas regiões, conferem a esses ambientes um papel na regulação do clima no planeta, influenciando na circulação global da atmosfera e o nível dos oceanos, no balanço global de calor e circulação oceânica, resultando num equilíbrio dos ciclos sazonais e tornando as condições de temperatura viáveis para a manutenção da vida no planeta Terra (YERGEAU et al., 2012; COWAN, 2014).

Além da sua influência climática global, o continente Antártico é conhecido por seus extremos ambientais e considerado um dos locais mais inóspitos da Terra em consequência das suas condições climáticas. Grandes variações de temperatura (-89,2 a 150°C) e salinidade, baixa disponibilidade de água, precipitação anual de menos de 5 cm, dessecação, longos períodos de ausência de luz, alta incidência de radiação solar, e ciclos de congelamento e descongelamento são alguns fatores relevantes que dificultam o desenvolvimento da (micro)biota no continente (COWAN; TOW, 2004; MARGESIN; MITEVA, 2011; COWAN, 2014).

Na Antártica são encontrados diferentes tipos de solo em distintos estágios de formação e que sofrem influência de diversos fatores ambientais. De maneira geral, grande parte do solo está coberto por gelo o ano todo e apresentam níveis baixos de nutrientes, como carbono, nitrogênio e fósforo, com pH alcalino e pouco úmido (AISLABIE et al., 2004; GILICHINSKY et al., 2005). Este ambiente edáfico e seu grau nutricional é influenciado pelas condições do ecossistema antártico em que se encontram, bem como pelo material advindo do oceano, pelas substâncias excretadas pelos animais e pelas plantas que habitam o local, e atualmente, com maior evidência, pelo recuo das geleiras devido ao aquecimento global (AISLABIE et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2010).

A Antártica, devido a todas as características ambientais, é considerada um mosaico de extremos, com diferentes ecossistemas (Figura 2), apresentando solos ornitogênicos, orgânicos e minerais, solos permanentemente congelados (*permafrost*), lagos continentais e subglaciais, geleiras, ecossistemas marinhos, bentônicos e pelágicos, assim como sítios geotérmicos, incluindo nascentes termais, fumarolas, solos quentes e hidrotermais (CAVICCHIOLI, 2015).



Figura 2. Continente Antártico e ecossistemas encontrados ao longo do continente e na Península da Antártica: a) ambiente orgânico e com crescimento vegetal, b) ambiente ornitogênico, c) vale seco, d) vulcão polar, e) fumarolas marinhas de profundidade e f) geleiras. Fonte: Adaptado de Abrahamsen (2012).

1.2 AMBIENTES GEOTERMAIS ANTÁRTICOS

De acordo com Boothroyd (2009) a atividade geotermal é causada pela transferência de calor do interior da Terra em direção à superfície e pode se manifestar de diversas formas, principalmente através da atividade vulcânica.

Os ambientes geotermiais são formados a partir de materiais magmáticos profundos, que são forçados em direção à superfície terrestre, aquecendo a água de subsuperfície a temperaturas que podem atingir valores acima do ponto de ebulição. Quando a água atinge temperaturas suficientemente altas, a pressão litostática força sua saída através de poros e fissuras, produzindo solos geotermiais, fumarolas, ventos hidrotermais, *hot springs* ou gêiseres, dependendo do abastecimento de água (VICKERS, 2012). Estes ambientes são amplamente distribuídos na Terra, mas são concentrados em áreas com alta atividade tectônica, como o continente Antártico (BOOTHROYD, 2009).

A maior parte dos vulcões na Antártica não mostram sinais de atividade (Figura 3), e somente quatro apresentam sítios geotermiais ativos, sendo três localizados no continente: Montes Erebus, Melbourne e Rittmann, em Victoria Land, e um localizado na Península Antártica – Ilha Deception. Estes ambientes vulcânicos consistem tipicamente em sedimentos minerais aquecidos pelo calor emitido das fumarolas e/ou fissuras, e são exclusivamente associados a vulcões geologicamente ativos (HERBOLD et al., 2014).

Victoria Land possui um maciço campo de vulcões extintos com os três ativos, e estes possuem habitats geotermiais de altitude alta com características químicas edáficas semelhantes entre si (BARGAGLI et al., 1996).

Monte Erebus é um estratovulcão (vulcão em forma de cone) localizado na ilha de Ross, no oeste do Mar de Ross e considerado o vulcão ativo mais ao sul da Terra. Está a 3.794 m de altitude, sendo o mais alto, possui um lago de lava fonolítica convectivo persistente e apresenta erupções estrombolianas diárias (KYLE, 1990). As atividades geotérmicas do vulcão criam cavernas, chaminés e torres de gelo devido aos processos de evaporação e condensação; e o principal gás emanado pelas fumarolas do Monte Erebus é CO₂, com temperatura atingindo 65°C na superfície e pH variando de neutro ao levemente alcalino (KYLE et al., 1992).

O Monte Melbourne também é um estratovulcão localizado ao norte de Victoria, e faz parte de um campo vulcânico de vulcões subglaciais e subaeriais que abrangem a maior parte da península e estende-se para as baías adjacentes (WÖRNER; VIERECK, 1987). Assim como o Monte Erebus, a atividade vulcânica está associada pela sua localização na região de rifte e sua última erupção se deu cerca de 200 anos (LYON, 1986). Observa-se a presença de fumarolas onde o solo é mais quente e perfis

de temperatura de 40-60°C, atingindo o máximo de 65°C e apresenta pH do solo de 5.1 (NATHAN; SHULTE, 1967).

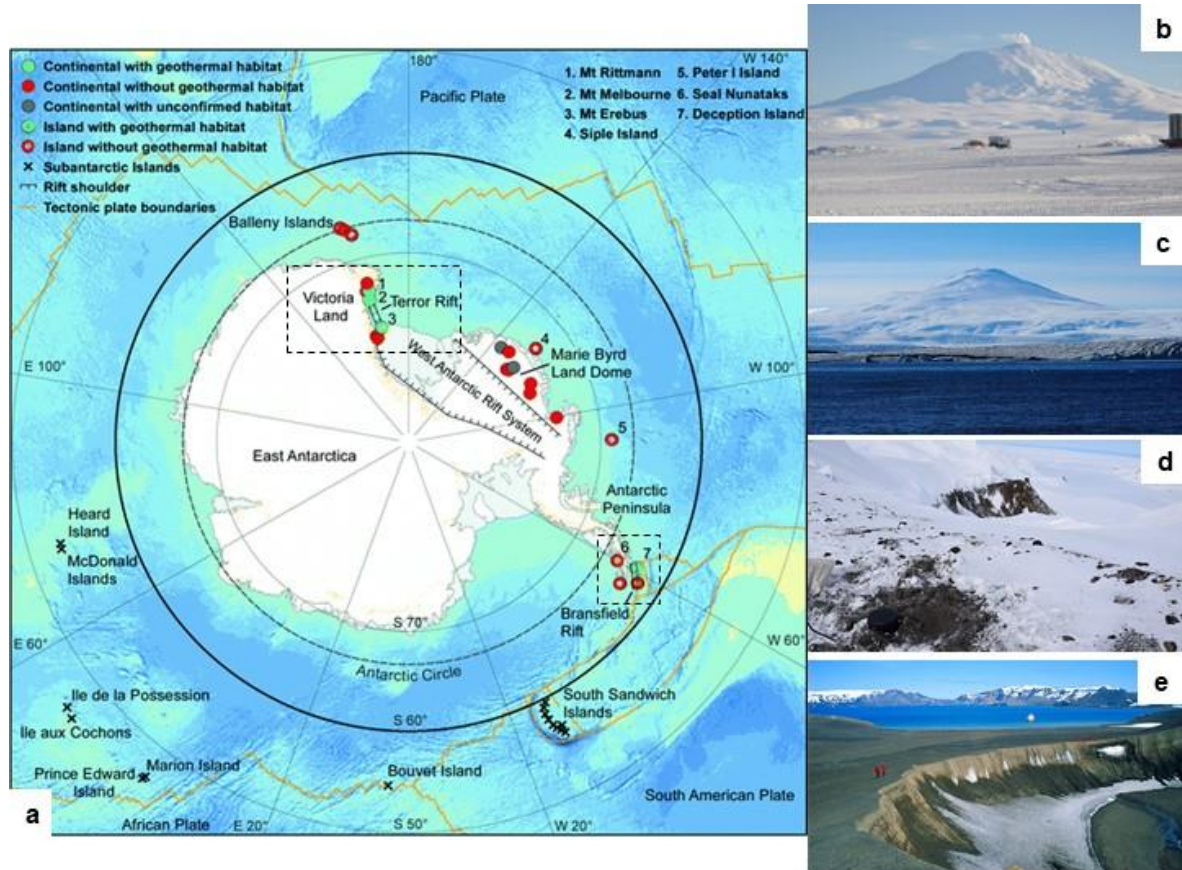


Figura 3. a) Distribuição dos vulcões ativos (verdes) e inativos (vermelho) presentes em Victoria Land, no continente e na Península Antártica, bem como as placas tectônicas responsáveis pela atividade geotermal; b) Imagem do vulcão Monte Erebus; c) Imagem do vulcão Monte Melbourne; d) Imagem do vulcão Monte Rittman; e) Imagem da ilha vulcânica Ilha Deception. Fonte: Adaptado de Herbold et al. (2014).

O vulcão descoberto mais recentemente foi o Monte Rittmann, que está localizado a 110 km do Monte Melbourne, a 2.600 m de altitude (ARMIENTI et al., 1991). Embora pouco se sabe sobre a origem da atividade geotermal, é observado extensa emissão fumarólica nos solos minerais do local, com temperatura superficial atingindo 40°C e 60°C no solo subsuperficial e pH do solo com valores em torno de 5.0 (BARGAGLI et al., 1996; HERBOLD et al., 2014).

E por fim, a ilha vulcânica Deception, um habitat geotermal de baixa elevação (HERBOLD et al., 2014).

1.2.1 Ilha Deception e suas condições termofílicas

O arquipélago das Ilhas Shetland do Sul (Figura 4) é pertencente à Antártica Marítima e fica localizada ao norte do mar de Bellingshausen, na costa oeste, à 120 km da Península Antártica. O arquipélago é composto por 29 ilhas, possuindo ao total uma área de 3.740 km², entretanto, apenas nove destas ilhas excedem 100 km² (ORHEIM; GOVORUKHA, 1982).

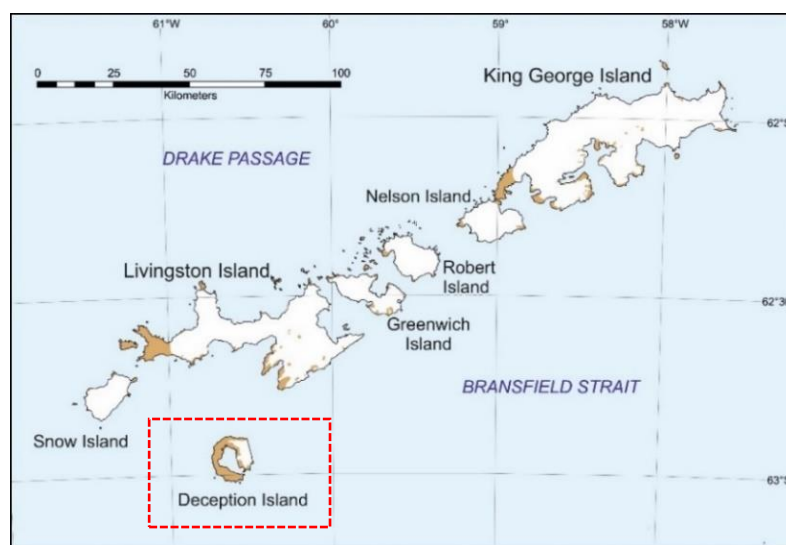


Figura 4. Arquipélago Ilhas Shetland do Sul, Península Antártica, com destaque para Ilha Deception. Fonte: Adaptado de British Antarctic Survey – Natural Environment Research Council (2015).

A Ilha Deception é uma das ilhas do arquipélago (62°57'S - 60°38'W), encontra-se no eixo de expansão da Bransfield Rift que separa o arquipélago da Península Antártica, e possui uma área de 98,5 km², sendo que 57% fica coberta por geleiras permanentes (LLARCH et al., 1997). É caracterizada por ser um estratovulcão complexo com formato de ferradura (Figura 5), e com um diâmetro abaixo do nível do mar de 25 km e de aproximadamente 13 km de diâmetro acima do nível do mar de (SMELLIE, 1988; BARCLAY et al., 2009).

A ilha vulcânica é rodeada de morros, sendo estes a borda de uma caldeira que foi inundada pelo mar devido à um colapso durante uma erupção forte há aproximadamente 10.000 anos atrás, formando uma grande baía denominada de Porto Foster, possuindo cerca de 9 km de comprimento e 6 km de largura. A baía tem

apenas uma entrada, Neptune's Bellows, que é estreita, com apenas 230 m de largura. No interior do Porto Foster formam-se outras baías, como Whalers Bay, Primero de Mayo Bay, Telefon Bay, Fumarole Bay (LLARCH et al., 1997; MARTÍ et al., 2013).

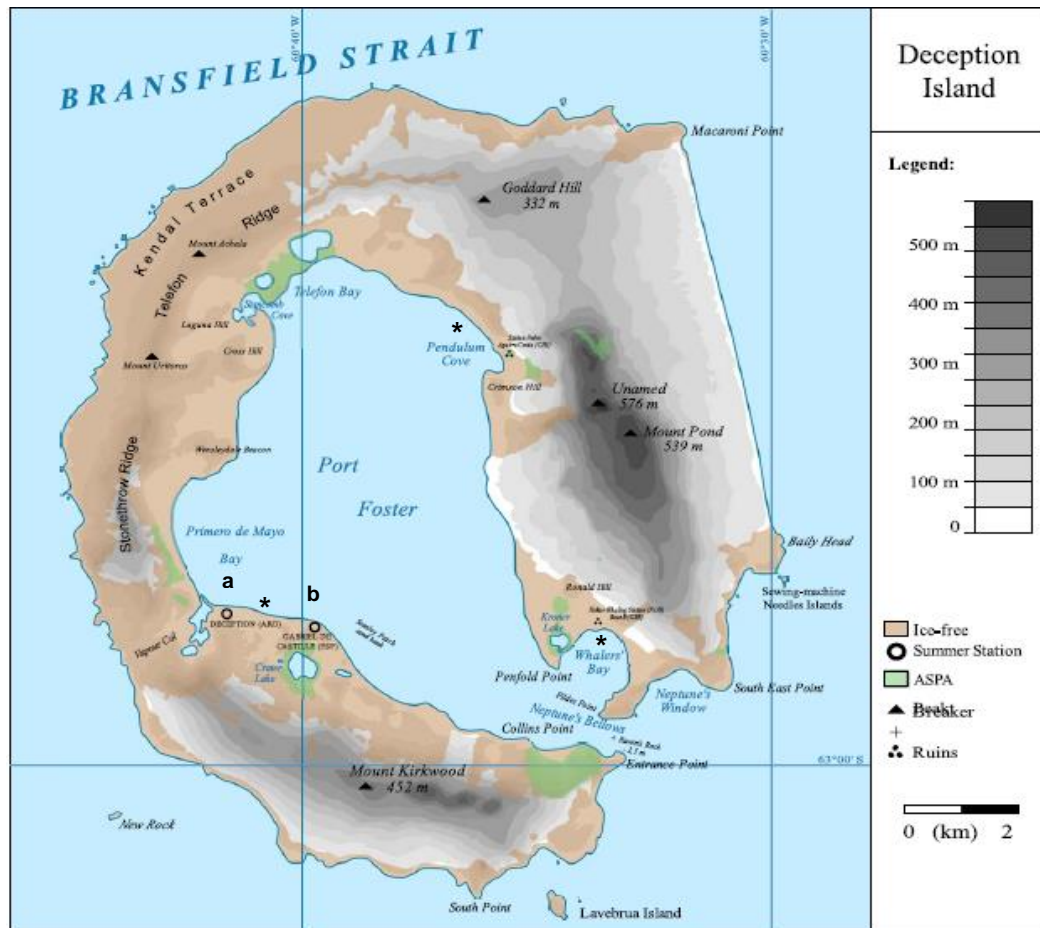


Figura 5. Mapa topográfico da Ilha Deception com os principais pontos geotérmicos (*) e estações de pesquisa: Estações da Argentina (a) e da Espanha (b). Fonte: Adaptado de Deception Island website (2016).

A ilha vulcânica é considerada a mais ativa do grupo de ilhas do arquipélago da Península Antártica, correspondendo a mais de vinte erupções ocorridas (que se têm conhecimento) nos últimos dois séculos (PALLÀS et al., 2001; SMELLIE et al., 2002). Emissões fumarólicas diárias, águas termais e solos quentes evidenciam que a atividade vulcânica continua ocorrendo na ilha (CASELLI et al., 2004). Esta alta atividade vulcânica tem minimizado tentativas dos países em manterem instalações permanentes no local. Atualmente, há duas estações científicas em uso no verão austral da Antártica, a Estação Científica Gabriel de Castilla, da Espanha e a Estação Científica Decepción, da Argentina (LLARCH et al., 1997).

O clima da ilha é caracterizado como marítimo polar, com temperatura média anual de -3°C , com máxima de 11°C e mínima de -28°C . Porém, em locais próximos a fumarolas, água e solos geotermais e solos quentes, existentes em decorrência da atividade vulcânica, as temperaturas podem chegar a 150°C , resultando, assim, numa temperatura de superfície que varia de -10 a 150°C (KUSAKABE et al., 2009).

Esses sítios geotérmicos são amplamente distribuídos ao longo da ilha, mas encontrados principalmente em Fumarole Bay, Whalers Bay e Pendulum Cove, e foram originadas provavelmente durante as últimas erupções entre 1967 e 1970 (HERBOLD et al., 2014). Apresentam condições de temperatura altamente variáveis, sendo que em Fumarole Bay são observadas temperaturas que variam de 90 a 110°C nos locais próximos às emissões fumarólicas e de temperaturas abaixo de zero à 50°C nas áreas com menor influência das fumarolas e mais próximas às geleiras. Em solos geotermais de Whalers Bay as temperaturas alcançam de 40 a 60°C , em Pendulum Cove, 70°C e em Unnamed Hill de 70 a 97°C (KUSAKABE et al., 2009; BLANCO et al., 2012).

Em relação às características edáficas da Ilha Deception, Cameron et al. (1968) e posteriormente Logan e Allan (2008) observaram em análises de diferentes locais da ilha, que esta é pobre em nutrientes ou possui uma composição iônica desequilibrada, apresentando concentrações extremamente baixas de nitrogênio e fósforo, bem como de matéria orgânica, e também foi observado altas concentrações de metais tóxicos, como cobre, zinco, cádmio, ferro e mercúrio.

Quanto à composição química das emissões fumarólicas, estas também variam conforme sua localização, uma vez que em Whalers Bay e Pendulum Cove as emanações são compostas especialmente por CO_2 , enquanto em Fumarole Bay há uma alta concentração de H_2S (AMENÁBAR et al., 2013). Adicionalmente têm-se compostos de enxofre e ferro, e vapor de água que são comumente emitidos pelas fumarolas presentes na Ilha, proporcionando um gradiente diverso de condições ambientais e oportunidades para a colonização microbiana (CAMERON; BENOIT, 1970; BENDIA et al., 2018b).

Quando comparada com os outros vulcões ativos da Antártica, a Ilha Deception apresenta algumas particularidades, como a influência marinha e temperaturas mais elevadas, visto que nos vulcões continentais são observadas temperatura de até

65°C). Ainda, as fumarolas de Deception encontram-se ao nível do mar, enquanto as do continente estão a mais de 2.000 m de altitude (COWAN, 2014).

A ilha vulcânica Deception é um ambiente único e interessante devido às suas características ambientais, onde há a presença de atividade geotermal contínua, visível pela emissão gasosa constante das fumarolas, que podem atingir até 150°C de temperatura na superfície, que contrasta com a alta porcentagem de geleiras presentes na ilha, com temperatura do solo abaixo do ponto de congelamento (AMENÁBAR et al., 2013).

É neste ambiente singular com fontes de calor em um ambiente congelado que pode-se encontrar microrganismos adaptados à essas condições ambientais extremas e que competem por espaço e nutrientes, denominados de extremófilos. Estes são distribuídos nos três domínios da vida, entretanto, os organismos procariontes (Bacteria e Archaea) são os mais representados nesse grupo (HORIKOSHI; BULL, 2011).

1.3 MICROBIOLOGIA EXTREMÓFILA DA ANTÁRTICA

Na Antártica pode-se observar uma estrutura trófica simples, formada por poucas espécies de animais e locais pontuais sem gelo onde cresce uma vegetação, restritas pelas condições ambientais extremas encontradas no continente (BRAVO; GRIFFITH, 2005; TEIXEIRA et al., 2010). Dessa maneira, muitas vezes as cadeias alimentares são formadas apenas por microrganismos (CARY et al., 2010).

Mesmo com todas as limitações encontradas na Antártica, é constantemente retratado em pesquisas científicas a diversidade microbiana dos solos da Antártica (TEIXEIRA et al., 2010; GANZERT et al., 2011; CURY et al., 2015), mostrando que mesmo diante de todas as condições adversas do ambiente – temperaturas extremamente baixas, dessecação, altos níveis de radiação ultravioleta, variação de pH e poucos nutrientes – não é inviabilizada a colonização por microrganismos.

Estes microrganismos capazes de sobreviverem a condições deste local inóspito são denominados de microrganismos extremófilos. São denominados desta forma devido a sua capacidade de se manter ativos a condições adversas em decorrência da sua estrutura e mecanismos a nível molecular adaptados, que os permitem tolerar os mais variados extremos de parâmetros físico-químicos do

ambiente em que estão inseridos (ANTRANIKIAN et al., 2005). Há diferentes tipos de extremofilia (Figura 6), entre eles microrganismos que possuem adaptação à extremos de temperatura (ZHANG; KIM, 2010).

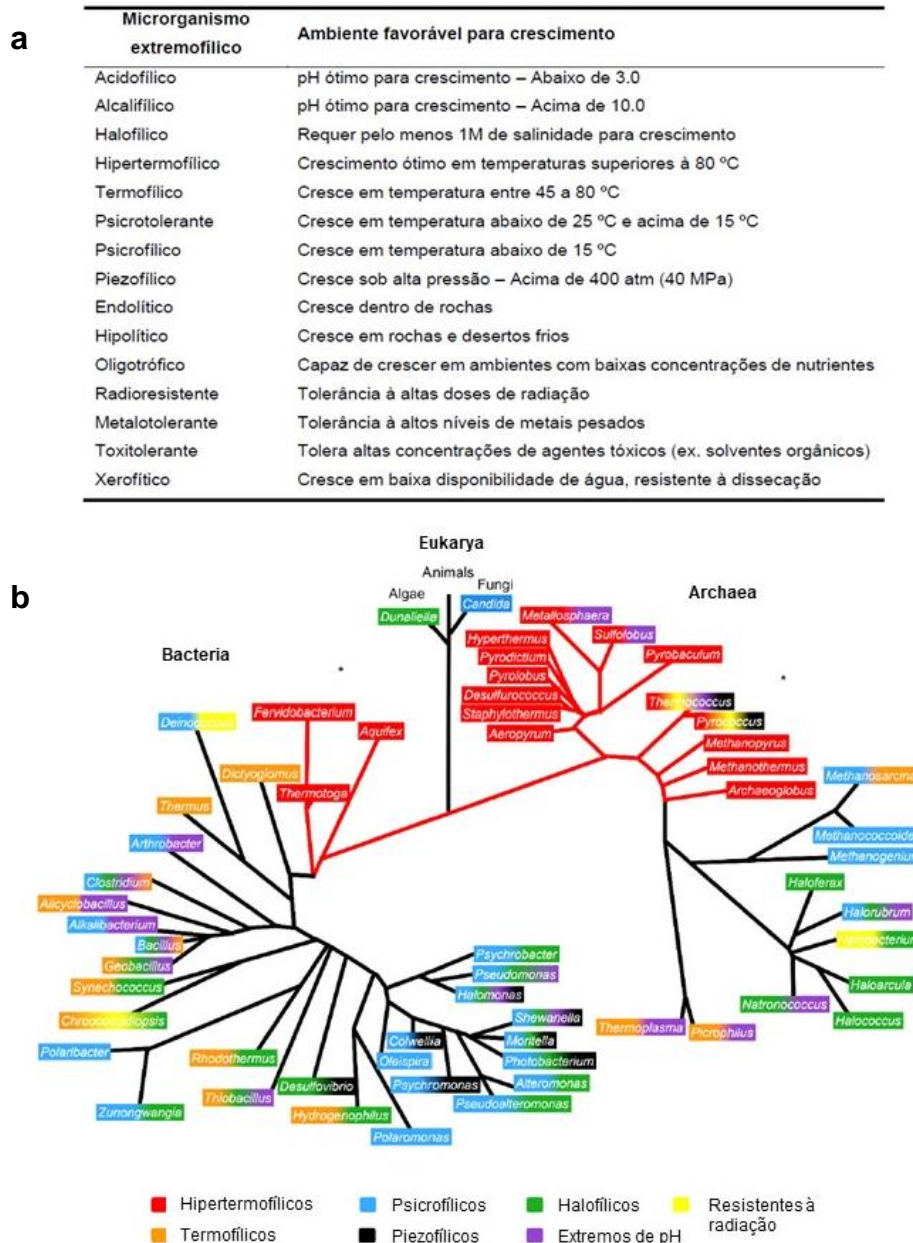


Figura 6. a) Classificação dos extremofílicos quanto aos parâmetros físico-químicos ambientais necessários para seu crescimento ideal; b) Árvore filogenética dos extremofílicos e suas resistências. Fonte: Adaptado de Dalmaso et al. (2016).

Os microrganismos capazes de resistirem a temperaturas negativas desenvolvem estratégias de adaptação para superar a influência direta ou indireta das baixas temperaturas. Esta microbiota adaptada ao frio pode ser dividida em

psicrofílicos obrigatórios e os facultativos, também denominados de psicrotolerantes, no qual os obrigatórios não crescem acima de 20°C e possuem temperatura ótima em torno de 15°C e mínima de 0°C ou menor. Já os facultativos, crescem em temperaturas próximas à 0 °C, porém apresentam maior crescimento acima de 20°C (BUZZINI et al., 2012).

Também há microrganismos que resistem e se desenvolvem otimamente em temperaturas altas e são denominados de termofílicos (45 a 85°C) e hipertermofílicos (acima de 85°C) (MADIGAN et al., 2016). Este tipo de extremofilia é observada nos sítios geotérmicos da Ilha Deception, onde os microrganismos que colonizam esses ambientes necessitam de adaptações fisiológicas para conseguirem sobreviver e crescerem, como estabilidade molecular das enzimas, flexibilidade estrutural, máquinas de síntese de proteína estáveis ao calor, adaptações de composição fosfolipídica da membrana, bem como a formação de endósporo, que é uma forma de resistência (NAZINA et al., 2001; LOGAN; ALLAN, 2008).

As alterações na membrana celular podem ser destacadas, na qual o grupo Archaea possui lipídeos modificados, que formam uma monocamada lipídica, enquanto bactérias termofílicas e hipertermofílicas possuem mais saturações em seus ácidos graxos, resultando em maior rigidez e estabilidade da membrana plasmática contra altas temperaturas (SILIAKUS et al., 2017). Nos estudos desenvolvidos por Mandelli et al. (2012a, 2012b), os autores observaram que os carotenoides desempenham um papel importante na estabilidade térmica das estruturas microbianas, uma vez que se insere na membrana citoplasmática, favorecendo seu fortalecimento. Adicionalmente, os carotenoides possuem atividade antioxidante, contribuindo para o equilíbrio redox.

Adaptações biológicas também estão presentes no nível molecular, pois essas condições extremas têm a capacidade de romper as ligações de hidrogênio da molécula de DNA, desnaturando-a. No grupo de arqueias hipertermofílicas, estas desenvolveram a capacidade de resistência térmica da dupla fita de DNA, que é aprimorada pela enzima girase reversa, que causa uma sobreposição de dobramento no DNA, aumentando consideravelmente sua estabilidade térmica (AUNG et al., 2015).

Outro mecanismo de adaptação microbiana em altas temperaturas, segundo Van Wolferen et al. (2013), é a transferência horizontal de genes, que funciona como

um reparador de danos no DNA, obtendo novos genes que podem ajudar a sua sobrevivência em condições extremas. Da mesma forma, as moléculas de RNA também são afetadas com altas temperaturas e, para evitar a desnaturação, estabilizar as estruturas secundárias de RNA, o conteúdo de GC é aumentado, assim como modificações pós-transcricionais são adicionadas (WU et al., 2012).

As altas temperaturas também provocam uma desestabilização das estruturas proteicas das células e algumas estratégias foram desenvolvidas para aumentar a estabilidade, como a presença de resíduos hidrofóbicos dentro de suas estruturas, que interagem com o núcleo da proteína (DONG et al., 2008). Outra estratégia é a presença de proteínas de choque térmico, que são expressas por todas as células em resposta a condições de estresse ambiental, onde desempenham funções acompanhantes, estabilizando novas proteínas e garantindo seu dobramento correto (CAVA et al., 2009).

Sítios geotérmicos são amplamente distribuídos por todo o mundo e proporcionam condições ótimas para o crescimento de termofílicos. Atualmente, maior atenção está sendo dada e um considerável número de microrganismos termofílicos e hipertermofílicos têm sido isolados de ambientes quentes terrestres e aquáticos, incluindo fontes hidrotermais marinhas profundas, nascentes quentes e vulcões (REYSENBACH et al., 2000; CASAMAYOR et al., 2001).

1.3.1 Microbiologia do vulcão antártico Ilha Deception

O continente Antártico é uma fonte de microrganismos extremos. Milhões de anos de isolamento produziram biodiversidade única com respostas adaptativas ao seu ambiente extremo. Embora o clima antártico seja principalmente frio, a presença de vários sítios geotérmicos, incluindo nascentes térmicas, fumarolas, solos quentes e hidrotermais, oferece ambientes ideais para o desenvolvimento de microrganismos termofílicos e hipertermofílicos (HERBOLD et al., 2014).

Como mencionado anteriormente, os sítios geotérmicos também estão presentes ao longo da extensão da Ilha Deception e poucos estudos são relatados na literatura. Totalizam-se oito estudos utilizando métodos dependentes de cultivo e quatro com metodologias independentes de cultivo (Figura 7).

O primeiro estudo em Deception foi conduzido por Cameron e Benoit (1970), que identificaram os microrganismos presentes nos cones de cinzas da erupção anterior, em 1967. As bactérias que foram identificadas são principalmente heterotróficas, não pigmentadas, com colônias amarelo pálido ou bege pálido e pertencentes aos gêneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* spp., *Pseudomonas* sp. e especialmente ao gênero *Bacillus* sp.

Estudos de Freier et al. (1988) em Telefon Bay, e Muñoz et al. (2011) em Fumarole Bay e Llarch et al. (1997) em diferentes lagos e Whalers Bay, indicaram a presença de bactérias termofílicas cultiváveis pertencentes aos gêneros *Geobacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Thermus*, tendo como exemplos *Brevibacillus thermoruber*, *Bacillus fumarioli*, *Geobacillus jurassicus* e *Bacillus thermantarcticus*.

No estudo de Llarch et al. (1997) foram isolados seis tipos distintos de bactérias termofílicas, caracterizadas como gram-positivas, aeróbias, formadoras de endósporos e que foram identificadas como espécies pertencentes do gênero *Bacillus*. Dois isolados foram identificados como estirpes termófilas de *B. licheniformis* e *B. megaterium*, mas as outras quatro estirpes não puderam ser identificadas. Todas as estirpes apresentavam crescimento em uma ampla faixa de temperatura, variando de 17 a 73°C, mas com crescimento ótimo entre 60 a 70°C.

Isolados de geleiras e fumarolas dos ambientes geotermiais de Whalers Bay e Fumarole Bay foram cultivados, crescendo 82 isolados psicofílicos a 4°C e 67 isolados termofílicos a 60°C. A análise filogenética usando o método de máxima verossimilhança para o gene *rrs* mostrou seis clados principais para termofílicos e cinco clados para psicofílicos. Esses clades incluem membros termofílicos dos gêneros *Geobacillus*, *Brevibacillus*, *Anoxybacillus*, *Thermus* e ordem Bacillales, e membros psicofílicos de *Arthrobacter*, *Psychrobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Sphingomonas*, de acordo com o banco de dados SILVA v.128 (BENDIA et al., 2018a).

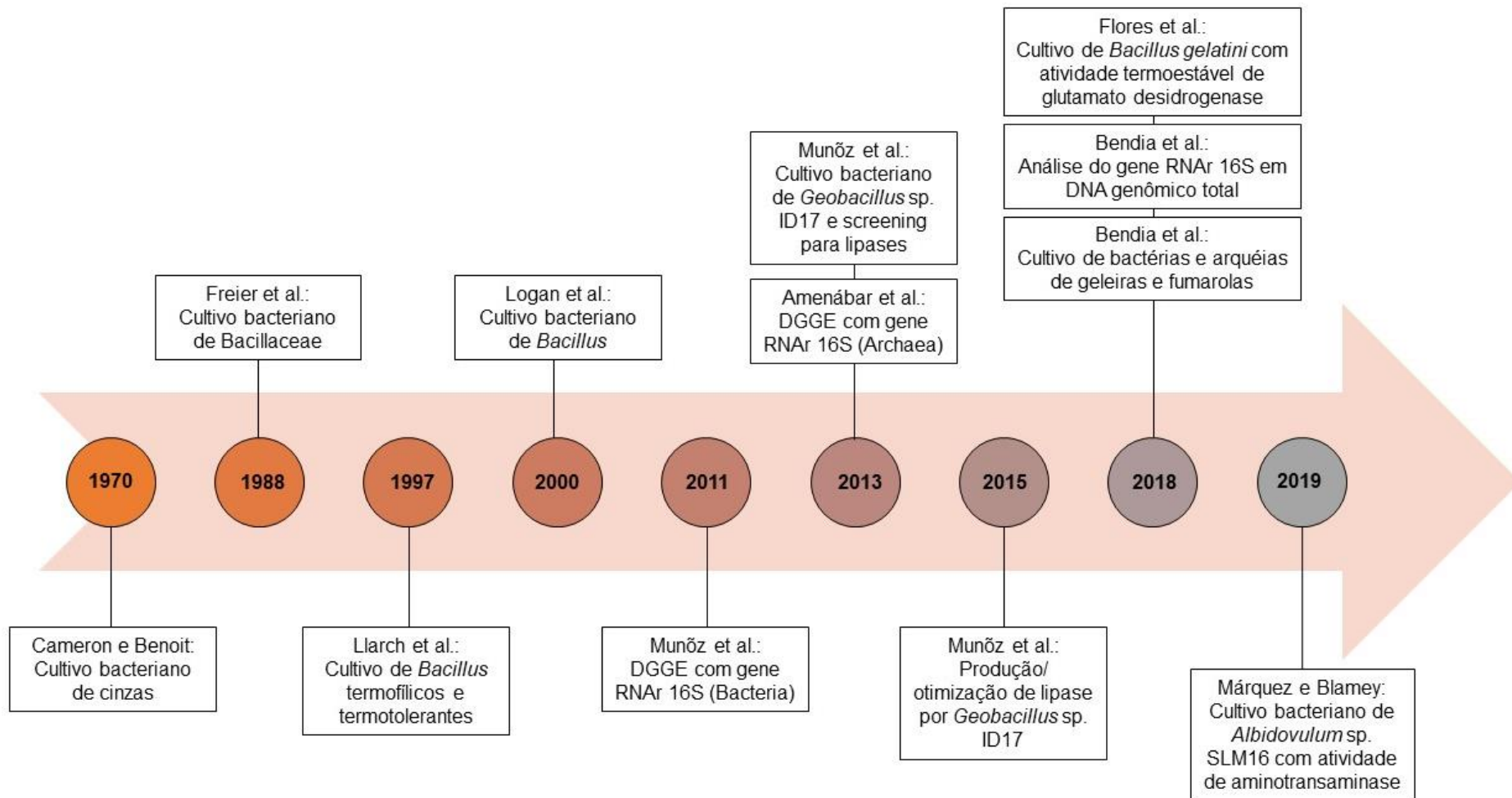


Figura 7. Linha do tempo com todas as pesquisas publicadas na área de microbiologia com amostras provenientes da Ilha Deception, iniciando na década de 1970 até a presente data. Fonte: Autores.

A amplitude da diversidade microbiológica encontrada em ambientes termofílicos de Deception foi consistentemente subestimada devido aos métodos procedimentais e experimentais que estavam disponíveis para uso e que limitavam o acesso da informação taxonômica e funcional de amostras de ambientes extremos (CASAMAYOR et al., 2001; CHRISTNER et al., 2001). Com o advento das tecnologias de biologia e molecular e bioinformática, novos estudos foram realizados utilizando métodos independentes de cultivo.

Empregando técnicas de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e sequenciamento de Sanger das bandas presentes no gel de eletroforese, Muñoz et al. (2011) observaram a presença de bactérias em amostras das fumarolas de Fumarole Bay. Os autores identificaram principalmente membros de Firmicutes e Thermus/Deinococcus, como *Thermus*, *Bacillus*, *Geobacillus* e *Brevibacillus*. Amenábar et al. (2013) também utilizou o DGGE, entretanto para arqueias, e detectou pela primeira vez em amostras Antárticas, os gêneros hipertermófilos *Thermococcus*, *Methanococcoides* e membros de Crenarchaeota não classificados.

Em uma análise mais recente, realizada por Bendia et al. (2018a, 2018b), utilizou-se técnica de cultivo e amplificação do gene *rrs* para caracterização da composição microbiana de dois ambientes geotermiais da Ilha Deception – Fumarole Bay e Whalers Bay. Nesse estudo, os autores tiveram o objetivo de descrever as comunidades microbianas ao longo de um gradiente de temperatura e geoquímica, através da abordagem de sequenciamento do gene *rrs*, utilizando a tecnologia de Miseq System – Illumina. Como resultados taxonômicos do sequenciamento do gene *rrs* foi observado a presença de Proteobacteria (43,75%), Bacteroidetes (17,11%), Verrucomicrobia (8,07%), Actinobacteria (7,86%), Planctomycetes (4,97%), Acidobacteria (2%), Chloroflexi (1,91%), Cianobactérias (0,69%), Armatimonadetes (0,43%), Firmicutes (0,38%), Elusiomicrobia (0,21%), e outros 32 filos diferentes (total de 1,40%) e não classificados (5,74%). Cerca de 43% das sequências analisadas foram enquadradas em 858 gêneros, sendo os mais representativos: *Thalassomonas*, *Flavobacterium*, *Luteolibacter*, *Ferruginibacter*, *Rhodanobacter*, *Dokdonella*, *Polaromonas*, *Chthoniobacter*, *Planctomyces*, *Simplicispira*, *Gemmatimonas*, *Arenimonas*, *Caldithrix*, *Patulibacter* e *Blastopirellula* (BENDIA et al., 2018b).

A análise taxonômica dos metagenomas da Ilha Deception realizada por Bendia (2016) mostrou a presença de representantes do Domínio Archaea, estes se

organizaram em três grupos de acordo com a temperatura ambiental das amostras – Fumarolas de 98°C, Fumarolas de até 80°C e geleiras. Nas fumarolas de 98°C foi observada abundância de 90% de Desulfurococcales, tendo como representantes o Filo Crenarchaeota e Classe Thermoprotei; nas amostras de fumarolas de até 80°C, foi exibida maior abundância de sequências classificadas na Ordem Nitrosopumilales; e associadas às geleiras, foram observadas alta abundância de grupos de arqueias metanogênicas, como Methanosarcinales e Methanomicrobiales.

Quanto à análise funcional dos metagenomas, as amostras de fumarolas de 98°C exibiram arqueias hipertermófilas relacionadas ao metabolismo do enxofre e à quimiolitotrofia, e por genes relacionados ao estresse oxidativo, reparo de DNA por excisão de bases e mecanismos de adaptação específicos de arqueias hipertermófilas (p. ex. termossomos e enzima girase reversa). Nas fumarolas de até 80°C foram observadas bactérias comuns de ambientes Antárticos, assim como arqueias marinhas oxidadoras de amônia, e por genes relacionados ao estresse osmótico, oxidação de enxofre, metabolismo do nitrogênio, fotossíntese e adaptação a altas e baixas temperaturas. Já as amostras de geleiras são compostas por bactérias típicas de ambientes Antárticos e arqueias metanogênicas, bem como por genes envolvidos com o estresse osmótico, fotossíntese, metabolismo do nitrogênio e adaptação a baixas temperaturas (BENDIA, 2016). Resumidamente, as comunidades são fortemente influenciadas pelas variações de temperatura e composição geoquímica.

Logan e Allan (2008) afirmam que a vida microbiana nos solos da Ilha Deception é dificultada pelas altas temperaturas, mas não é o único fator limitante. As baixas concentrações de nutrientes, matéria orgânica e as altas concentrações de metais tóxicos observados no solo também restringem a colonização. Complementarmente, Muñoz et al. (2011) cita que o conhecimento microbiológico atual sugere que há uma forte correlação entre a presença e diversidade microbiana com a composição geoquímica da localização geográfica.

Compostos de enxofre e ferro, dióxido de carbono (CO₂) e vapor de água são comumente emitidos pelas fumarolas presentes na Ilha, proporcionando um gradiente de distribuição desses elementos, criando um mosaico de condições ambientais e oportunidades para a colonização microbiana (CAMERON; BENOIT, 1970; BENDIA et al., 2018b). Bendia et al. (2018b) observou em sua análise geoquímica de

sedimentos de dois locais geotérmicos da Ilha que amostras perto das fumarolas eram ricas em ferro, sódio, magnésio e sulfato, enquanto as amostras próximas às geleiras apresentaram valores mais elevados de compostos nitrogenados, e que estas mudanças atuam como uma pressão seletiva forte sobre a estrutura das comunidades microbianas.

Os microrganismos que vivem em ambientes extremos sofreram e continuamente sofrem pressão seletiva e, a fim de lidar com os constantes desafios ambientais apresentados a eles, estes desenvolveram adaptações estruturais e metabólicas para permanecerem ativos e estáveis frente às condições adversas, levando a capacidades metabólicas únicas e versáteis (STRAUB et al., 2017). Estas características únicas fazem dos microrganismos termofílicos e hipertermofílicos da Antártica alvo de estudos relacionados à bioprospecção para biotecnologia industrial.

1.4 POTENCIAL DE BIOPROSPECÇÃO DE TERMOFÍLICOS ANTÁRTICOS

Bioprospecção é definida como uma forma de localizar, avaliar e explorar de forma sistemática e legal a diversidade existente em determinado local. Seu principal objetivo é a busca de genes e/ou organismos, bem como seus produtos de interesse biotecnológico para fins comerciais. Este tipo de estudo, além de buscar novos conhecimentos sobre a área e sua biota, valoriza a diversidade microbiana, o que auxilia na sua preservação e encoraja novos estudos (TRINCONE, 2011; FELICIO et al., 2012).

A triagem de atividade biológica é o primeiro passo da busca por aplicação biotecnológica na microbiologia ambiental, buscando por microrganismos que tenham algum atributo desejável dentre os muitos isolados de um ambiente natural ou antrópico. A partir dela, são selecionados os que obtiveram os melhores resultados, culminando no desenvolvimento de um produto ou processo de valor comercial (SMRITHI et al., 2013; MONCIARDINI et al., 2014).

Conforme descrito no tópico anterior, um dos mais importantes grupos de bactérias encontrados em solos geotérmicos na Antártica são pertencentes à Bacillaceae, um grupo de bactérias formadoras de endósporos aeróbios. Por apresentarem essa característica, são capazes de sobreviverem a uma ampla distribuição de ambientes extremos de temperatura (LOGAN et al., 2000). Os

termófilos encontrados neste grupo são *Alicyclobacillus*, *Aneurinibacillus*, *Anoxybacillus*, *Brevibacillus*, *Caldakalibacillus*, *Sulfobacillus*, *Thermobacillus*, *Ureibacillus* e *Vulcanibacillus*, no qual aproximadamente 20% destes táxons formadores de endósporos termofílicos foram isolados de solos geotérmicos e 50% de ambientes geotérmicos da Antártica (FLORES et al., 2013).

Frente às adaptações para altas temperaturas, os microrganismos termofílicos e hipertermofílicos têm sido alvo de intensos estudos biotecnológicos, uma vez que estes microrganismos são considerados candidatos com alto potencial de ser fonte para nossos bioprodutos, como genes, metabólitos, enzimas e outros bioprodutos que sejam aplicáveis aos diferentes aspectos industriais (STRAUB et al., 2017).

Dos poucos estudos microbiológicos realizados no vulcão Antártico Ilha Deception, três deles direcionaram sua pesquisa para a microbiologia aplicada. Muñoz et al. (2013, 2015) tiveram o objetivo de explorar a produção de lipases com base no estudo anterior do grupo, onde os autores observaram representantes bacterianos dos gêneros *Geobacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Thermus* (MUÑOZ et al., 2011). Um dos isolados de *Geobacillus* foi identificado como produtor de lipase termofílica. Esta bactéria, chamada *Geobacillus* sp. ID17, foi capaz de produzir quatro lipases, das quais a denominada Lip1 foi observada como a mais termoestável e capaz de hidrolisar ligações éster de ácidos graxos de cadeia longa em condições alcalinas (pH 8,0 a 10,0) e termofílicas (65 a 80°C). Estas propriedades fazem de Lip1 um excelente candidato para a sua utilização em diferentes aplicações, tais como um aditivo num produto detergente e na síntese química (MUÑOZ et al., 2013; MUÑOZ et al., 2015).

No trabalho recente, Flores et al. (2018) tiveram o objetivo de apresentar a caracterização parcial de um microrganismo termofílico que exibe atividade de glutamato desidrogenase, uma enzima que desempenha um papel fundamental no metabolismo de carbono e nitrogênio. O microrganismo foi identificado como *Bacillus gelatini* pelo gene *rrs* cresce otimamente a 50°C e em pH 8,0, e produz glutamato desidrogenase que é termoestável em temperaturas entre 37 e 50°C e pH 8,0. Este é o primeiro relato de um microrganismo da Antártida contendo uma glutamato desidrogenase termoestável que mantém sua atividade em uma ampla faixa de temperaturas, tornando-o de interesse biotecnológico e aplicação em indústria alimentícia. E mais recentemente, Márquez e Blamey (2019) isolaram um novo termofílico de Whalers Bay que foi identificado como *Albidovulum* sp. SLM16. A estirpe

apresentou atividade de aminotransaminase estável em condições termofílicas, sendo reportado pela primeira vez no continente.

Diante desse contexto e da falta de conhecimento aplicado da microbiologia de Deception e do que esta pode fornecer para os setores industriais, torna-se importante a realização de estudos na busca por bioprodutos termofílicos, uma vez que se encaixam na biotecnologia industrial emergente e podem realizar processos industriais em condições adversas ou para a substituição de produtos químicos por produtos mais ambientalmente sustentáveis. Potenciais usos são na indústria de bioenergia, produtos farmacêuticos, médicos, cosméticos, alimentos, papel e celulose, ferramentas de genética molecular, detergentes, couro, assim como na indústria do petróleo (RAMPELOTTO, 2016), nas vertentes de biorremediação de ambientes extremos contaminados por petróleo e na recuperação avançada do óleo por microrganismos.

1.4.1 Biorremediação de ambientes Antárticos contaminados por petróleo

Biorremediação é uma tecnologia de remediação de ambientes contaminados, como por exemplo, solos impactados pelo derramamento de petróleo e/ou seus derivados, utilizando microrganismos presentes no local ou adicionados (GOJGIC-CVIJOVIC et al., 2011; CRISAFI et al., 2016). Esta técnica é baseada na exploração da atividade metabólica de microrganismos vivos para degradar, modificar ou mineralizar compostos orgânicos tóxicos, transformando-os em substâncias pouco tóxicas e/ou não tóxicas, como água e dióxido de carbono (PEIXOTO et al., 2011; ATLAS; HAZEN, 2011). O processo de biorremediar solos contaminados por compostos petrogênicos, na maioria das vezes, é lento, levando décadas para alcançar a descontaminação total do ambiente. Porém, a velocidade do processo é influenciada por diversos fatores, como parâmetros físico-químicos do local, comunidade microbiana degradadora de petróleo, histórico da poluição, concentração e composição do contaminante (SCHEDLER et al., 2014).

Os tratamentos de biorremediação podem ser classificados em 1) *in situ*, quando o tratamento é feito no local, sem remoção do material contaminado; e 2) *ex situ*, quando o material contaminado é retirado do local para realizar o seu tratamento, e depois de descontaminado, volta ao local de origem (DAS; CHANDRAN, 2011).

Para que o processo de biorremediação aconteça, as condições ambientais para a biodegradação do contaminante devem estar favoráveis, como pH, nutrientes, oxigenação, temperatura e umidade, permitindo o melhor crescimento microbiano e sua atividade degradadora (XU; LU, 2010; KARIGAR; RAO, 2011). Dessa maneira, ao longo dos anos de pesquisa na área de biorremediação, diferentes estratégias foram elaboradas para aumentar ou aperfeiçoar a eficiência dessa técnica, no intuito de acelerar o processo de descontaminação do ambiente (SANTOS et al., 2010).

Uma das estratégias de melhoria é chamada de bioestímulo (Figura 8), que consiste na manipulação do ambiente para otimizar o crescimento da comunidade microbiana e acelerar o metabolismo, adicionando ao ambiente doadores de elétrons, água, oxigênio, corretor de pH e nutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio) (KARIGAR; RAO, 2011; CURY et al., 2015).

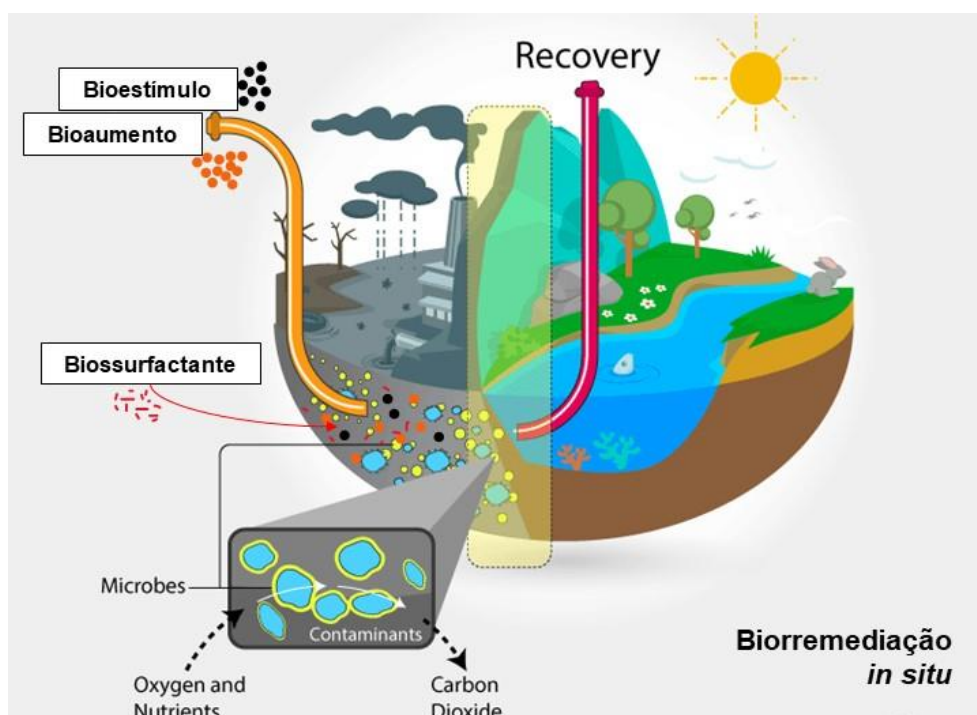


Figura 8. Processo de biorremediação e estratégias de bioaumento (adição de microrganismos com capacidades de degradação do contaminante), bioestímulo (adição de nutrientes) e adição de biossurfactante para facilitar/acelerar a degradação do contaminante pelos microrganismos. Fonte: Adaptado de <https://byjus.com/biology/bioremediation/>. Acesso em 04 jul. 2019.

O bioestímulo é uma metodologia comumente aplicada em evento de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo, pois quando se tem a contaminação, os níveis de carbono são rapidamente elevados e ocorre o desbalanceamento nos

níveis de nitrogênio e fósforo, devido ao rápido consumo desses nutrientes enquanto têm-se a assimilação do carbono (TAKETANI et al., 2009). Com o acúmulo de carbono e falta dos nutrientes, o processo de biodegradação dos contaminantes ocorre de forma mais lenta e pode cessar se houver outros fatores limitantes ao processo, sendo essencial o balanceamento de nutrientes (AISLABIE et al., 2008; SANTOS et al., 2010).

Outra estratégia utilizada é o bioaumento, que consiste na adição de um ou mais microrganismos, cultivados previamente em laboratório por bioprospecção (isolamento e seleção), que possuam características para a degradação do contaminante (JESUS et al., 2015a). Esta técnica é empregada quando as comunidades nativas capazes de degradar o contaminante se apresentam em número reduzido e se tem objetivo de intensificar a população microbiana degradadora (XU; LU, 2010; DAS; CHANDRAN, 2011).

O bioaumento pode se dar pela adição de uma ou mais estirpes microbianas. A literatura menciona que o uso de um grupo de microrganismos especializados na degradação do hidrocarboneto, ou seja, um consórcio de microrganismos, apresentam resultados melhores quando comparados à utilização de estirpes únicas (GOJGIC-CVIJOVIC et al., 2011). Isso se deve ao fato de que cada estirpe é responsável em degradar uma ou várias frações do petróleo, criando substratos para o crescimento de outros microrganismos em função da complementaridade metabólica entre os membros do consórcio, e conseqüentemente resultando numa maior taxa de mineralização (PEIXOTO et al., 2011; AGARWAL; LIU, 2015).

Alguns microrganismos degradadores de hidrocarbonetos de petróleo também são capazes de produzir biossurfactantes, que são moléculas orgânicas anfipáticas com ação tensioativa produzidas por microrganismos (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011).

Quando os biossurfactantes são liberados no ambiente contaminado, seus monômeros interagem com o petróleo e com a água, ar e/ou solo, e por ter ação tensoativa, o surfactante reduz a tensão superficial e interfacial do ambiente com o óleo, aumentando a solubilidade e a biodisponibilidade, auxiliando o acesso das bactérias para degradação dos hidrocarbonetos de petróleo como fonte de carbono (Figura 9a), e conseqüentemente promove a passagem de oxigênio devido à retirada do óleo, resultando na otimização da biodegradação aeróbia (MAIER; SOBERÓN-

CHÁVEZ, 2010). Quando a interface está saturada, os monômeros de biossurfactante se organizam esfericamente, formando micelas (Figura 9b).

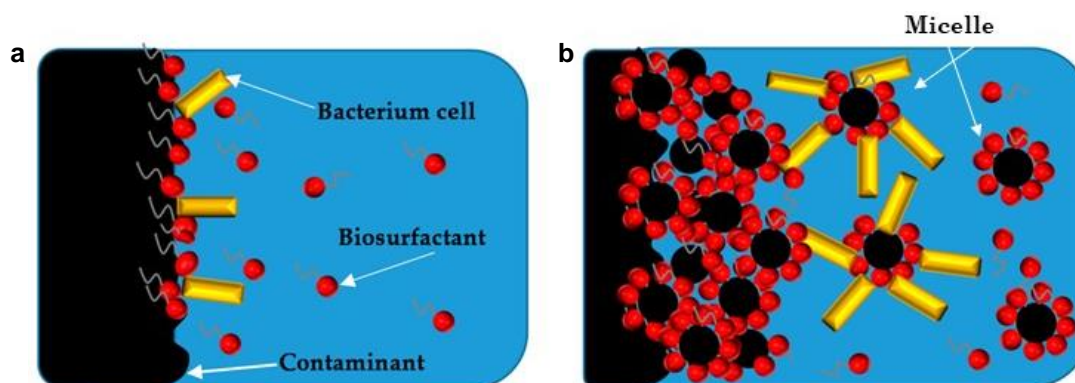


Figura 9. Ilustração da atividade do biossurfactante em um ambiente contaminado por petróleo (a), formando micelas (b) após saturação da superfície e resultando na facilitação da ação degradadora por bactérias degradadoras do contaminante. Fonte: Adaptado de Santos et al. (2016).

1.4.1.1 Contaminação ambiental e biorremediação na Antártica

Cada vez mais é frequente ambientes naturais sendo afetados por ações antrópicas, como derramamento de combustível derivado de petróleo, metais pesados e disposição inadequada dos resíduos, sendo estas ameaças para os ambientes como a Antártica, caracterizada por ser um ecossistema único, remoto e sensível, que compreende um dos últimos locais remanescentes pouco tocados por ações humanas (AISLABIE; FOGHT, 2010).

Os tipos de contaminantes na Antártica são diversos, incluindo poluentes orgânicos, observados por Bargagli (2008), hidrocarbonetos, evidenciados por Jurelevicius et al. (2012), Cabrerizo et al. (2014), Cury et al. (2015), Jesus et al. (2015a), metais pesados identificados por Hur et al. (2007) e Van de Velde et al. (2011), assim como abandono de objetos e pela combustão de carvão, petróleo e gasolina (PACYNA; PACYNA, 2001; PLANCHON et al., 2002; MISHRA et al., 2004).

Um dos contaminantes mais proeminentes no continente Antártico é o petróleo e seus derivados, uma vez que este é amplamente utilizado para a geração de energia, aquecimento, operação de máquinas, aviões e navios, que são necessários para o desenvolvimento das atividades humanas realizadas (AISLABIE et al., 2006). Arelado a isso, houve muitos anos em que a Antártica recebeu forte influência de

atividade antrópica sem que houvesse uma legislação que norteasse a disposição e correta eliminação de resíduos, o que acarretou em uma contaminação crônica de hidrocarbonetos de petróleo no solo (VÁZQUEZ et al., 2009).

O petróleo é considerado a mistura mais complexa de compostos orgânicos já encontrada na Terra (HEAD et al., 2006; ATLAS; HAZEN, 2011). Essa complexidade é resultado de uma mistura de hidrocarbonetos e de compostos orgânicos como asfaltenos (fenóis, ácidos graxos, cetonas, ésteres e porfirinas) e resinas (piridinas, quinolinas, carbazoles, sulfóxidos e amidos) que são encontrados no petróleo. Entretanto, nos fluídos petrolíferos, os hidrocarbonetos são os constituintes mais importantes e presentes em maior quantidade (DAS; CHANDRAN, 2011; ATLAS; HAZEN, 2011).

As principais famílias químicas dos hidrocarbonetos são os alcanos, os hidrocarbonetos aromáticos e poliaromáticos. Os alcanos, também chamados de alifáticos, possuem hidrocarbonetos de cadeia aberta (n-alcanos) e os ciclo-alcanos, cujos átomos estão arranjados em forma de anel; e os hidrocarbonetos aromáticos, caracterizados pela presença de ao menos um anel de benzeno (PLANCKAERT, 2005). Em menor quantidade têm-se os hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA), família de mais de 100 compostos orgânicos formados por carbono, hidrogênio e possuindo dois ou mais anéis aromáticos condensados (benzeno) (KAMANGAR et al., 2009). São formados, principalmente, em processos de combustão incompleta de matéria orgânica e emitidos por fontes naturais, onde a contribuição vem da queima espontânea de florestas e emissões vulcânica, e principalmente por fontes antropogênicas, como a queima de combustíveis, como petróleo e seus derivados (LOPES et al., 1996). Apesar de estarem em menor quantidade na composição do petróleo, estão entre os mais tóxicos constituintes para a biota, apresentando propriedades carcinogênicas e mutagênicas (TOBISZEWSKI; NAMIESNIK, 2012).

Adicionalmente a esses contaminantes que ocorrem em todo o território Antártico, na Ilha Deception, especificamente, houve a presença de estações baleeiras desde o início do século XIX até meados do século XX. Após a Grande Depressão em 1929, os preços do óleo de baleia, tornaram a estação na Ilha Deception economicamente inviável e sendo abandonado anos depois, deixando no local caldeiras, tanques e resquícios das operações baleeiras (LLARCH et al., 1997).

Atualmente, o local tem sido utilizado para suportar a logística pesqueira (RUBERTO et al., 2008).

Por ser um vulcão ativo, com mais de 20 erupções identificadas nos dois últimos séculos (BARTOLINI et al., 2014), a Ilha Deception tem minimizado tentativas de países em manterem instalações permanentes no local. Atualmente, há duas estações científicas operantes: a Estação Científica Gabriel de Castilla, da Espanha e a Estação Científica Decepción, da Argentina, porém há várias estações inativas e destruídas, como as do Chile, Noruega, Reino Unido, Argentina e Espanha (LLARCH et al., 1997).

Contribuindo para a contaminação ambiental da Antártica por pesquisadores e profissionais que fazem a exploração e gestão do continente, tem havido um aumento crescente da visitação no local por turistas. Isso se deve à presença de características vulcânicas, como fumarolas, solos quentes, águas termais e o apelo visual e sensorial de estar num local remoto como a Antártica (TIN et al., 2009). Um exemplo de contaminação e dos riscos que essa atividade reflete sobre a Ilha Deception é o derramamento de petróleo na Ilha em decorrência do aterramento do cruzeiro norueguês Nordkapp, que ocorreu em fevereiro de 2007 (RUBERTO et al., 2008).

Na Ilha Deception, a contaminação por hidrocarbonetos foi relatada por Cabrerizo et al. (2016), que teve como objetivo analisar a presença de hidrocarbonetos antropogênicos e biogênicos, bem como a determinação das concentrações dos mesmos em diferentes ilhas do arquipélago Shetland do Sul. Cita-se que há a contaminação por hidrocarbonetos, tanto de HPA, alcançando uma concentração que variou de 12 a 46 ng gdw⁻¹, quanto de alcanos, mostrando resultados que variaram de 7 a 1769 ng gdw⁻¹. Os autores também evidenciaram que as causas dessa contaminação se devem às ações antropogênicas, como o abandono das estações de pesquisa, estação baleeira, turismo e estações de pesquisa operantes na ilha, sendo observadas a maior concentração de hidrocarbonetos em Whalers Bay, Pendulum Cove e Fumarole Bay.

A presença destes compostos em ambientes edáficos Antárticos representa um perigo à saúde e segurança do meio ambiente devido à sua toxicidade para a maioria das formas de vida (AISLABIE; FOGHT, 2010). Entretanto, muitos microrganismos do solo, como as bactérias, possuem a capacidade de utilizar hidrocarbonetos como

fontes de carbono e energia para seu crescimento, oxidando, imobilizando, volatilizando e transformando em substâncias não tóxicas (STROUD et al., 2007).

O estudo de Jesus et al. (2015b) traz um levantamento de todos os estudos sobre técnicas de biorremediação aplicadas nos solos da Antártica e concluíram que o conhecimento em relação aos procedimentos de emergência no continente é escasso, e que não há estratégia a ser seguida após derrames acidentais de petróleo na Antártica. Também relatam que como em outras áreas contaminadas, o processo de biorremediação realizada no solo antártico é específica do local e do contaminante, e ocorre com maior eficiência sob condições aeróbicas. Para tanto, se faz necessário estudos preliminares de análise do solo, triagem molecular, isolamento microbiano e realização de biorremediação em microcosmos *in situ*, para garantir a precisão dos resultados.

Para que a biorremediação de ambientes Antárticos impactados por hidrocarbonetos de petróleo seja uma ferramenta viável e efetiva, é imprescindível o conhecimento da presença e estrutura da comunidade microbiana presente no local capaz de biorremediar o local pela degradação dos contaminantes.

1.4.1.2 Degradação microbiana de hidrocarbonetos de petróleo na Antártica e ambientes geotermiais

As bactérias têm sido descritas como o principal grupo microbiano capaz de degradar estes compostos orgânicos, sendo os agentes mais ativos na degradação primária (BROOIJMANS et al., 2009; DAS; CHANDRAN, 2011). Com base em Wang et al. (2010), apenas entre as bactérias, mais de 75 gêneros já foram descritos possuindo espécies capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia, como espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Gordonia* e *Sphingomonas*.

Foi relatado por Aislabie et al. (2008), Bell et al. (2011), Bell et al. (2013), Cury et al. (2015) e Jesus et al. (2015a) que diversas bactérias autóctones de ambientes extremofílicos possuem a capacidade para degradar hidrocarbonetos, tais como *Sphingomonas glacialis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas grimontii*, *Pseudomonas frederiksbergensis*, *Acinetobacter guillouiae* e *Pseudomonas graminis*, que são exemplos de espécies degradadoras encontradas na Antártica.

Em ambientes termofílicos encontrados ao redor do Planeta foram descritas bactérias degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo de espécies pertencentes aos gêneros *Geobacillus*, *Bacillus*, *Thermus*, *Thermoleophilum*, *Aeribacillus*, *Nocardia*, *Anoxybacillus*, *Paenibacillus* e *Microbacterium*, sendo *Geobacillus* o mais representativo e a família Bacillaceae corresponde a 81% dos termofílicos reportados.

Os hidrocarbonetos que podem ser utilizados por degradadores são variados, incluindo n-alcenos saturados e ramificados, alcenos, compostos alicíclicos e heterocíclicos, e hidrocarbonetos aromáticos. No entanto, diferem quanto a sua susceptibilidade ao ataque microbiano, uma vez que há alguns hidrocarbonetos com características mais recalcitrantes e que não são degradados ou são degradados parcialmente, como os HPAs (ATLAS; BRAGG, 2009). Varjani (2017) descreve a susceptibilidade de degradação de hidrocarbonetos por ação microbiana na seguinte classificação: alcanos lineares > alcanos ramificados > monoaromáticos > alcanos cíclicos > poliaromáticos > asfaltenos.

O contato entre o microrganismo e o hidrocarboneto pode ocorrer por uma simples adesão ou através da facilitação de biossurfactantes, que são moléculas orgânicas de caráter anfipático secretadas por diversos grupos microbianos e que irão facilitar a emulsificação de hidrocarbonetos e facilitar a mobilidade, adesão e descolamento celular (RUGGERI et al., 2009; YAN et al., 2012). Um exemplo dado por Madigan et al. (2016) é a espécie *Alcanivorax borkumensis*, que é uma bactéria que cresce apenas na presença de hidrocarbonetos ou ácidos graxos e piruvato, e também produzem surfactantes glicolipídicos para auxiliarem na degradação do óleo, promovendo sua solubilização. Quando solubilizado, o óleo é captado pelas bactérias mais rapidamente e conseqüentemente catabolizado.

Dentro da célula microbiana, a degradação dos poluentes orgânicos, para utilização como fonte nutricional, ocorre a partir de processos oxidativos, catalisados por oxigenases e peroxidases (ROJO, 2009; DAS; CHANDRAN, 2011). De forma resumida, têm-se a ação de oxigenases, seguida pela rota de degradação periférica até a geração dos ciclos intermediários, finalizando com a utilização desses produtos gerados nos ciclos de respiração e biossíntese celular (ROJO, 2009). Esta utilização irá depender da biodisponibilidade e também das oxigenases grupo-específicas ligadas à membrana do organismo (Van HAMME et al., 2003). Atlas e Hazen (2011) citam que, em condições normais, os hidrocarbonetos entram em contato com os

degradadores e são mineralizados em dióxido de carbono e água, compostos não tóxicos para o ambiente.

Algumas particularidades podem ser descritas a respeito da degradação de petróleo em ambientes termofílicos, tanto pelas características físicas do óleo sob condição de alta temperatura, quanto dos mecanismos de degradação pelos microrganismos termofílicos (ZHENG et al., 2011). Altas temperaturas levam ao aumento das reações cinéticas e alta transferência de massa, aumentando consequentemente a biodegradação. Adicionalmente, a alta temperatura tem influência significativa sobre a biodisponibilidade de hidrocarbonetos de petróleo, especialmente os poliaromáticos, devido à redução da viscosidade, que leva a um aumento de seus coeficientes de difusão (MEHTA et al., 2016; STRAUB et al., 2017). Dessa maneira, a biodegradação é significativamente avançada pelo aumento da temperatura do meio e o uso de termofílicos tornam este processo mais eficiente.

A biodegradação tem sido extensivamente estudada no contexto de mesofílicos (microrganismos que crescem otimamente a 20-40°C), no qual os mecanismos de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo alifáticos e aromáticos têm sido elucidados. No entanto, em comparação, poucos trabalhos foram realizados sobre a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo por termofílicos (NZILA, 2018).

Os mecanismos de degradação do n-alcano observados em termofílicos são similares aos encontrados nos mesofílicos, no qual o processo é iniciado pela ação de monooxigenases, enzimas que incorporam um átomo de O₂ na cadeia n-alcano, ou por dioxigenases, enzimas que podem incorporar dois átomos de O₂. Ambas as vias levarão à geração de álcool, que será então convertido em ácidos graxos, e estes serão então submetidos à β-oxidação para gerar energia e CO₂ através do metabolismo central das bactérias (ROJO, 2009).

Os genes envolvidos nesta via foram estudados principalmente em *Pseudomonas* sob condições mesofílicas, no qual a via n-alcano é controlada por dois operons: O operon alkBFGHJKL, que codifica componentes do sistema alkB (o sistema n-alcano hidroxilase ligado à membrana), e o operon alkT/alkS, que codifica a enzima rubredoxina redutase, que também regula a expressão do operon alkBFGHJKL (Van BEILEN et al., 2006). Este gene AlkB também foi encontrado em bactérias termofílicas dos gêneros *Geobacillus* e *Aeribacillus* (TOUROVA et al., 2016).

Além do sistema AlkB, outras duas oxigenases foram relatadas em mesófilos: as monooxigenases do citocromo P450, que pertencem à família do citocromo CYP153 e estão relacionadas a oxidação de n-alcenos de cadeia média (C5-C17) e as dioxigenases dependentes da flavina, codificadas pelo gene *almA* e que está associada à oxidação de n-alcenos de cadeia longa (C10-C30) (Van BEILEN et al., 2006; THRONE-HOLST et al., 2007). Entretanto, esses dois sistemas não foram encontrados em degradadores termofílicos de n-alcenos, mas é relatado a expressão de um novo tipo de sistema, o *LadA*, uma monooxigenase dependente de flavina da família das luciferases bacterianas, e é responsável pela degradação de n-alcenos de cadeia longa (C15-C36) (Figura 10a).

Em relação à degradação de hidrocarbonetos aromáticos monocíclicos (Figura 10b), o fenol tem sido o mais estudado em termofílicos. Assim como ocorre nos mesofílicos, a degradação do fenol se inicia por hidroxilação para gerar catecol, mediada pela enzima fenol hidroxilase. Porém, este catecol é metabolizado por clivagem orto ou meta, na presença de catecol 2,3-dioxigenase nos mesofílicos, enquanto nos termofílicos, foi observado que apenas meta-clivagem está presente (OMOKOKO et al., 2008).

O mecanismo de degradação de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA) em termófilos tem recebido pouca atenção e foram estudados apenas os compostos naftaleno, fenantreno e antraceno (Figura 10c). Como os mesófilos, os termófilos iniciam a degradação de HPAs pela ação de mono ou dioxigenases, enzimas que medeiam a formação de compostos aromáticos mono- e di-hidroxilados; seguido de clivagem, seja entre os grupos hidroxilo (meta-clivagem) ou proximal a um dos dois grupos hidroxila (orto-clivagem), para gerar um composto aromático com menos anéis. De forma resumida, nos termofílicos, a abertura do primeiro anel do composto naftaleno ocorre apenas na posição meta, como ocorre com o fenol; o do antraceno ocorre através da orto-clivagem; e para fenantreno ocorre tanto a meta quanto a orto-clivagem. Na degradação de compostos monoaromáticos, estudos mostram o uso preferencial das vias de meta-clivagem, ainda que ambas as vias (orto e meta) existam (NZILA, 2018).

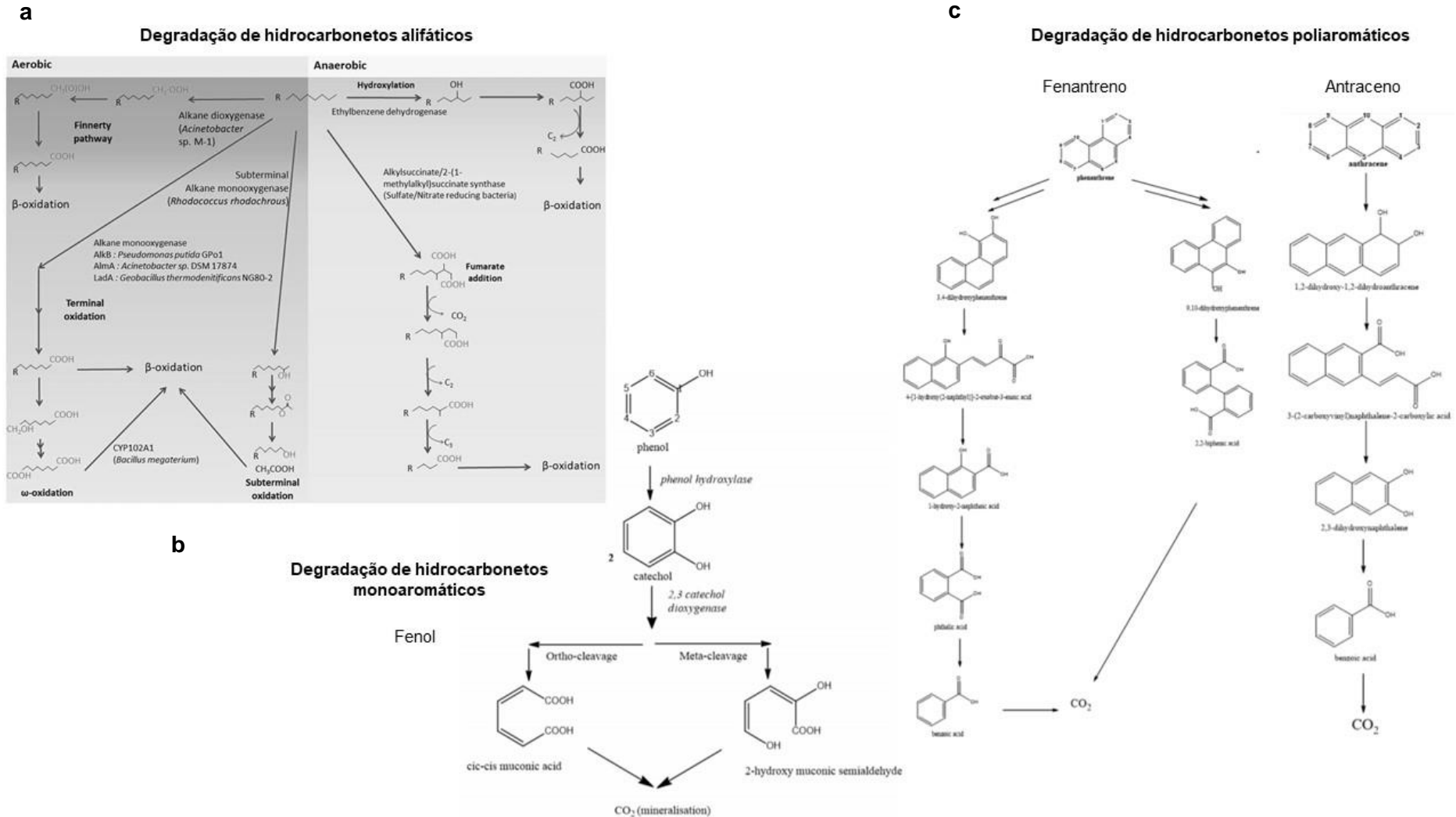


Figura 10. a) Degradação de hidrocarbonetos alifáticos em condição aeróbia e anaeróbia. Fonte: Park e Park (2018); b) Vias de degradação de fenol por termofílicos, apenas por meta-clivagem; c) Vias de biodegradação do fenantreno e vias de biodegradação do antraceno por bactérias termofílicas. Fonte: Adaptado de Nzila (2018).

A identificação de bactérias, metabolismos e genes responsáveis por catalisar essas reações biogeoquímicas é um dos maiores avanços da ecologia microbiana. Estudando os genes catabólicos que codificam para enzimas de degradação biológica de hidrocarbonetos é possível investigar diretamente microrganismos com um potencial de biodegradação específica, como biomarcadores da presença e distribuição de bactérias com esses genes (NYSSÖNEN et al., 2008; LIANG et al., 2011).

Diante destas observações, os termofílicos em geral e os degradadores de petróleo são dotados de vias bioquímicas únicas, sendo fonte de enzimas ou moléculas para exploração e aplicação biotecnológica.

Na busca por trabalhos que avaliem o potencial bacteriano em degradar hidrocarbonetos de petróleo existente em sítios geotérmicos da Ilha Deception, não foram encontradas tais informações na literatura, sendo uma área a ser explorada, uma vez que é de interesse biotecnológico o uso de termofílicos para a biodegradação de hidrocarbonetos e por moléculas que auxiliam esse processo, como biossurfactantes. Realizar a bioprospecção com base nos *screening* baseados em cultivo e independentes de cultivo é o primeiro passo para aplicação em estratégias de biorremediação.

1.4.2 Recuperação avançada do óleo por microrganismos (MEOR)

Além dos processos de biorremediação, a indústria petrolífera pode aplicar os conhecimentos de biodegradação bacteriana de hidrocarbonetos de petróleo e produção de biossurfactantes em condições termofílicas na recuperação do petróleo.

O petróleo é retirado do reservatório primeiramente a partir de um poço de perfuração, utilizando a pressão da sobrecarga da Terra na formação do óleo ou por bombeamento. À medida que esta produção primária se finda, alguns dos poços são convertidos em poços injetores de água ou de gases, caracterizando a recuperação secundária do petróleo. Após o esforço da produção secundária, dois terços do óleo original ainda permanecem no local, e então são aplicadas medidas terciárias, chamadas de métodos de recuperação avançada de óleo (EOR). A recuperação terciária pode empregar químicos aprimorados, tais como adição de polímero e adição alcalina, entre outros; uso de medidas térmicas, como injeção de vapor; e ainda, a

recuperação de óleo por ação microbiana, conhecida como MEOR – *Microbial Enhanced Oil Recovery* (Figura 11) (BROWN, 2010).

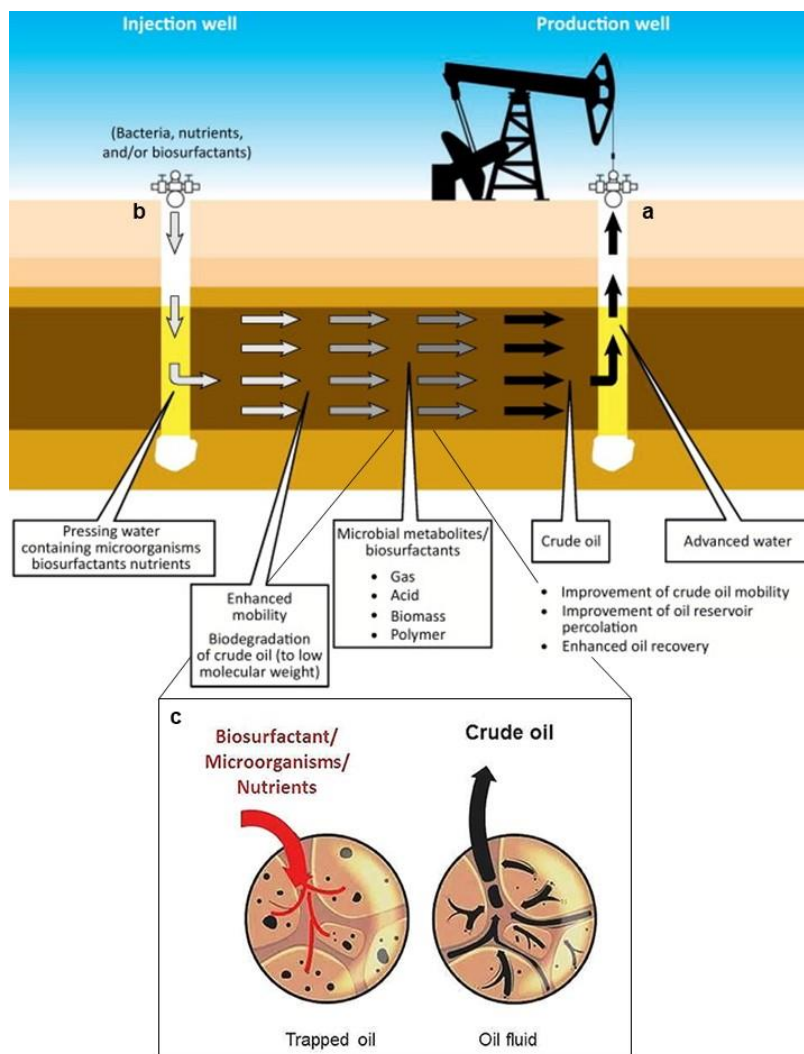


Figura 11. Recuperação avançada do óleo em reservatórios através da aplicação de microrganismos e/ou biossurfactantes. Os microrganismos degradam óleo cru de elevado peso molecular em menor peso molecular; os biossurfactantes reduzem a tensão interfacial entre o óleo e a rocha, e entre óleo e água, favorecendo a movimentação do óleo nos poros do reservatório. Fonte: Adaptado de Marchant e Banat (2012).

De acordo com Chai et al. (2015), a tecnologia de MEOR apresenta uma série de vantagens, podendo-se citar o aumento da produtividade dos campos petrolíferos; aumento do total de petróleo produzido e operação mais eficiente de poços e campos de petróleo; a instalação do MEOR é menos dispendiosa, porque as bactérias e metabólitos injetados são de baixo custo quando comparados aos produtos químicos sintéticos; é ambientalmente amigável, pois os produtos microbianos são

biodegradáveis; reduz o tempo de inatividade das operações; aumenta a qualidade do petróleo produzido pelo aumento de alcanos leves (<C₂₀), biodegradação de componentes de hidrocarbonetos pesados de alto peso molecular, transforma compostos orgânicos contendo enxofre; e emulsifica o petróleo bruto, facilitando a mobilização para o poço de produção devido à redução da tensão interfacial entre óleo e rocha, e óleo e água, superando as forças capilares.

O MEOR pode ser dividido em: produção *ex situ* dos metabolitos MEOR, tais como biossurfactantes, biopolímeros e emulsionantes, utilizando bactérias exógenas ou indígenas com capacidade de produzir esses metabólitos nas condições de reservatório. Neste caso, são produzidos em laboratório e depois injetadas em soluções aquosas; e produção *in situ*, onde a produção é resultado da atividade microbiológica que ocorre diretamente no reservatório (MARCHANT; BANAT, 2012).

Atualmente, a taxa de recuperação média mundial é de cerca de 30% e nos Estados Unidos é de 39%. No entanto, muitos especialistas acreditam que, no futuro previsível, o fator de recuperação possa chegar a 50-60% e até mesmo 80%. Para tanto, é necessário avançar os atuais processos de recuperação avançada de óleo ou melhorá-los, para torná-los mais eficientes (SANDREA; SANDREA, 2007). Dessa maneira, pesquisadores se dedicam há décadas para encontrar microrganismos e metabólitos microbianos que possam ser utilizados em MEOR, sendo os ambientes extremos locais pouco acessados e explorados quanto à capacidade de fornecer material para ser utilizados nesses processos.

Como mencionado, existem diferentes formas que os microrganismos podem auxiliar na recuperação de petróleo, seja por ação microbiana ou por produtos advindos destes, como os biossurfactantes. Entretanto, estes precisam estar aptos a serem ativos sob as severas condições ambientais do reservatório de óleo, como alta temperatura, pressão, salinidade e baixos níveis de oxigênio (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998). Assim, têm-se a necessidade de bioprospectar ambientes mais hostis, principalmente ambientes geotermiais com temperaturas altas e semelhantes ao reservatório de petróleo, que podem revelar microrganismos a serem aproveitados em MEOR.

1.5 METODOLOGIAS DEPENDENTES E INDEPENDENTES DE CULTIVO: FERRAMENTAS PARA BIOPROSPECÇÃO

Microrganismos constituem dois dos três domínios da vida na Terra e exibem uma vasta biodiversidade e versatilidade metabólica, permitindo que habitem e prosperem mesmo nas condições ambientais mais extremas. A magnitude da biodiversidade observada entre microrganismos é elevada em comparação com os demais organismos, e suas características intrínsecas torna-os um recurso muito lucrativo e inesgotável para a prospecção de (novas) moléculas bioativas. Apesar da comunidade científica reconhecer o potencial de bioprospecção, mais de 99% dos microrganismos ainda precisa ser explorado (PHAM; KIM, 2012).

Esta bioprospecção pode ser realizada com base em métodos dependentes de cultivo, como isolamento e análises genômicas, bem como em métodos independentes de cultivo, podendo-se citar as análises metagenômicas.

1.5.1 Bioprospecção baseada no cultivo

A bioprospecção dependente do cultivo pode envolver várias etapas, como isolamento, triagem e purificação do microrganismo alvo, e são tipicamente conduzidas em laboratório em placas. Também pode haver a otimização dos métodos de cultivo pelas variações do substrato e parâmetros físico-químicos, como temperatura, pH, nutrientes e oxigênio (VESTER et al., 2015).

Devido às condições laboratoriais não serem as mesmas do ambiente de origem, onde é difícil retratar os fatores ambientais, fatores abióticos, composição e dinâmica microbiana com possível coexistência, o cultivo microbiano é reduzido e seleciona-se os adaptáveis às limitações, constituindo-se apenas uma fração da total diversidade da comunidade (AKONDI; LAKSHMI, 2013).

Entretanto, mesmo havendo estas limitações, o isolamento de extremófilos é realizado com meios de cultura e sob condições específicas. A partir dos isolados, a bioprospecção pode ser realizada para as mais diversas áreas, podendo-se citar a busca por microrganismos com potencial de degradação de diferentes frações de hidrocarbonetos de petróleo e por microrganismos com a capacidade de produzir

biossurfactante, fazendo uso de diferentes metodologias para estas finalidades (descritas no tópico 4, Material e métodos).

Os microrganismos que despertam interesse podem ser identificados via amplificação do gene *rrs*, que é amplamente utilizada nas pesquisas de ecologia microbiana de bactérias e arqueias, e ITS (*Internal Transcribed Spacer*) para fungo, pois apresenta regiões altamente conservadas, as quais permitem o desenho de primers de PCR específicos, e regiões hipervariadas, as quais são utilizadas para inferir relações filogenéticas entre os microrganismos (WARD et al., 1990; DUARTE, 2010).

O sequenciamento da amplificação do gene *rrs* é realizado, dentre outras técnicas, pelo sequenciamento de DNA Sanger, que consiste no princípio da incorporação terminal de dideoxinucleotídeos marcados, juntamente com a eletroforese capilar (SANGER et al., 1977). No contexto da ecologia microbiana, essa técnica possibilita o sequenciamento de até centenas de fragmentos de genes por estudo, e por análise de similaridade com bancos de dados, identificar taxonomicamente o microrganismo.

Visando a elucidar o potencial metabólico dos microrganismos, o genoma completo pode ser sequenciado e analisado quanto as funções de interesse.

1.5.1.1 Sequenciamento de genoma completo

O sequenciamento do genoma completo (*Whole Genome Sequencing* – WGS) se dá em diferentes plataformas e o utilizado no presente estudo foi Illumina Miseq. Nesta plataforma é possível gerar cerca de 30 milhões de *reads* (denominação de sequências para esta plataforma) pareados com aproximadamente 300 pb cada (CAPORASO et al., 2012).

O WGS tem sido fundamental na identificação da estirpe desejada e comparação com outros isolados de interesse, assim como para a compreensão das funções dos genes encontrados, vias metabólicas e potencial gênico para biotecnologia por meio do *screening* funcional. No nível genômico, essas abordagens funcionais levaram a descoberta de várias novas enzimas, antibióticos e outros biomoléculas com aplicações terapêuticas e biotecnológicas (LEE et al., 2011).

Termofílicos degradadores de hidrocarbonetos de petróleo podem ser identificados explorando as informações disponíveis sobre as sequências do genoma.

Podem ser procurados genes genéricos codificando enzimas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos de petróleo nas sequências do genoma (NZILA, 2018). Se há a presença dos genes de interesse, podem ser iniciados estudos de cultivo para avaliar a capacidade do termofílico em crescer na presença de diferentes substratos com hidrocarbonetos de petróleo, uma vez que só a presença do gene não diz se é expresso e transcrito.

Até o momento, cerca de 30% a 40% dos genomas totalmente sequenciados de vários organismos contêm genes sem função atribuída, uma vez que a análise funcional é realizada por comparação com genomas sequenciados e disponíveis nas bases de dados. Estes genes sem função ou desconhecidos, são possivelmente genes novos. Dessa maneira, deve-se utilizar diferentes abordagens de análise funcional, como anotação funcional geral utilizando diferentes instrumentos e anotação com base em dados de genes específicos de interesse (FERRER et al., 2016).

Apesar de todos os avanços que podem ser realizados com base nos isolados e genômica dos isolados, apenas uma pequena minoria de microrganismos de uma amostra ambiental pode ser cultivada em laboratório deixando o enorme potencial de bioprospecção da diversidade não cultivável, inexplorada (UFARTÉ et al., 2015). Sabendo-se dessa limitação, iniciaram-se os estudos para bioprospecção baseadas em técnicas moleculares, que não requerem o isolamento e cultivo microbiano.

1.5.2 Bioprospecção baseada nas técnicas independentes de cultivo

Antes do desenvolvimento de técnicas moleculares, os estudos de ecologia microbiana e bioprospecção de metabólitos microbianos eram baseados em métodos de isolamento e cultivo de microrganismos em laboratório. Porém, estimativas indicam que apenas 1-5% dos microrganismos do ambiente são cultivados nas condições laboratoriais, subestimando extremamente a diversidade microbiana (AMANN et al., 1995). Esta dificuldade é ainda mais vidente ao se considerar os ambientes extremos, onde o isolamento e cultivo de microrganismos são ainda mais complexos e difícil de se emular, devido à composição geoquímica e condições ambientais extremas (DUARTE, 2010; MUÑOZ et al., 2011).

Com esta limitação, exigiu-se o desenvolvimento de técnicas para contornar a dependência da cultura e obter acesso à maior diversidade de microrganismos, podendo-se estudar holisticamente o sistema biológico e seus potenciais para aplicação biotecnológica (MUKHERJEE et al. 2017).

As técnicas independentes de cultivo baseiam-se na análise do DNA diretamente extraído de amostras ambientais, podendo ser classificadas em dois grandes grupos: os dependentes de primers específicos e amplificação (PCR), como o sequenciamento do gene *rrs* (bactéria e arqueia) e ITS (fungo), e os independentes de primers e amplificações específicas, como a técnica de Metagenoma *shotgun* (descrito no tópico 1.5.2.1).

Estas técnicas têm contribuído de maneira significativa por oferecerem métodos sensíveis, rápidos e precisos para analisar a microbiota e suas funções no ambiente, sem que haja a necessidade de isolamento e cultivo, revelando a existência de um elevado número de microrganismos não-cultiváveis, sua diversidade e funcionalidade (HUGENHOLTZ; TYSON, 2008; MADIGAN et al., 2016).

1.5.2.1 Sequenciamento shotgun

O termo “shotgun” refere-se à etapa em que o DNA ambiental extraído é totalmente fragmentado em comprimentos de aproximadamente 400 pb e as bibliotecas são construídas através desses fragmentos, não dependentes de amplificação com primers específicos. Em seguida, o sequenciamento dessas bibliotecas segue os princípios descritos para o sequenciamento do gene *rrs* pela plataforma MiSeq da Illumina. Porém, a complexidade das sequências do Metagenoma é muito maior em relação ao sequenciamento de *amplicons*, já que diversos genes e genomas estarão sendo analisados. Por esse motivo é necessário utilizar uma plataforma que gere uma grande quantidade de *reads*, como é o caso da plataforma HiSeq, também da Illumina, a mais empregada atualmente para as análises de Metagenoma, no qual é gerado em torno de 300 milhões de *reads* pareados de 150 pb cada (CAPORASO et al., 2012).

Além disso, a quantidade de dados gerados por HiSeq requerem uma enorme capacidade de processamento, que deve ser suprida pelo uso de clusters de computadores ou serviços de computação em nuvem, e despende-se muito tempo,

suporte computacional e necessita-se de pipelines adequados para a realização das análises. Algoritmos recentemente desenvolvidos para construir genomas inteiros a partir de amostras ambientais refinaram, corrigiram e revolucionaram a compreensão da árvore da vida (PARKS et al., 2018; WILKINS et al., 2019).

A Metagenômica tem se tornado a principal ferramenta para estudos relacionados à diversidade funcional, função ecológica e o potencial metabólico das comunidades microbianas, uma vez que fornece a composição genética de comunidades microbianas sem o desafio técnico de cultura e isolamento (KYRPIDES et al., 2014; YARZA et al., 2014). Entender a diversidade funcional pode auxiliar também no desenvolvimento de novos meios de cultura e técnicas de cultivo capazes de isolar um maior número de microrganismos, por meio de *insights* surgidos da análise da dinâmica microbiana.

O Metagenoma *shotgun* têm sido proposto como a abordagem funcional mais robusta para a descrição de comunidades microbianas em seus habitats naturais, visto que, teoricamente, todas as sequências de DNA de todos os organismos presentes em uma determinada amostra são analisadas (FERRER et al., 2011), podendo-se avaliar a presença ou ausência de genes envolvidos em vias metabólicas de interesse. Os conjuntos de dados metagenômicos obtidos são anotados por mapeamento dos genes e fragmentos de genes em famílias, fornecendo uma estimativa de sua representação relativa. Em seguida, é atribuído papéis às proteínas codificadas pelos genes sequenciados (KUNIN et al., 2008).

A exploração da informação metagenômica funcional fornece uma grande oportunidade para descobrir e isolar novas cepas de termofílicos degradadores de hidrocarbonetos de petróleo, incluindo hipertermofílicos que são ainda mais difíceis de serem cultivados em condições laboratoriais. A metagenômica funcional permite a identificação de genes relacionados à degradação de petróleo e bioprodutos que auxiliam o processo presentes na comunidade microbiana. Após identificação dos genes, estes podem ser clonados e funcionalmente expressos (UFARTÉ et al., 2015). Além disso, permitem inúmeras inferências sobre vias metabólicas envolvidas no catabolismo do poluente pelos microrganismos, descrevendo e melhorando a compreensão das bases genéticas e moleculares das reações envolvidas nos processos de degradação em condições termofílicas (NZILA, 2018).

Assim, a metagenômica emergiu como uma ferramenta valiosa com aplicações em diversos campos, incluindo medicamentos, energias alternativas, remediação, biotecnologia, agricultura, biodefesa e forense (BASHIR et al., 2014; KODZIUS et al., 2015; FERRER et al., 2016). Adicionalmente, a exploração desta abordagem no contexto da degradação de hidrocarbonetos por termofílicos contribuirá significativamente na descoberta de genes novos e únicos que poderão ser utilizados nas vertentes de degradação do poluente.

Para o presente estudo, a análise dos dados metagenômicos gerados em plataforma Hiseq Illumina foi realizado para investigar aspectos taxonômicos e funcionais de ambientes geotermiais Antárticos, utilizando ferramentas recentes de bioinformática através de *pipeline* para processar dados metagenômicos. O *pipeline* utilizado foi o MetaWRAP (Figura 12), descrito por Uritskiy et al. (2018) e adaptado pelo grupo *Microbial Systems Bioinformatics* do Instituto Helmholtz, Alemanha. É caracterizado por ser um pipeline modular que automatiza as principais tarefas da análise metagenômica, através da extração de *drafts* genômicos individuais, chamados de *bins*.

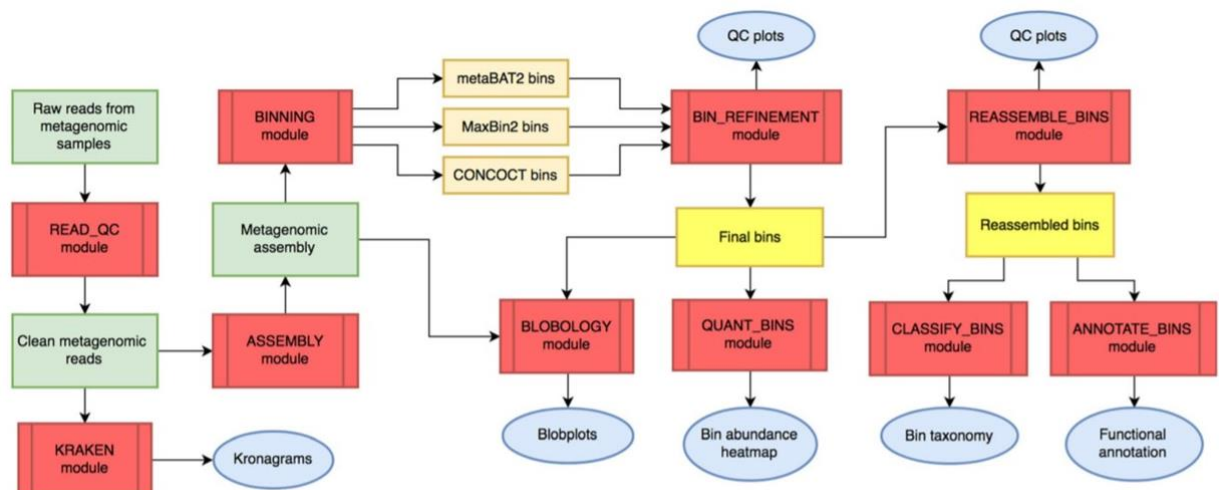


Figura 12. a) Fluxograma flexível do MetaWRAP para análise de dados metagenômicos. Fonte: Uritskiy et al. (2018).

Este *pipeline* emprega ferramentas que permitem a análise e interpretação de dados taxonômicos de alta resolução gerados a partir de levantamentos genéticos do gene *rrs* e estimativa de abundância, juntamente com instrumentos de previsão das funções existentes nas amostras metagenômicas, que permitem investigar a dinâmica funcional dessas comunidades microbianas.

Algumas ferramentas se destacam, como a ferramenta *DAS Tool* (*Dereplication, Aggregation and Scoring Tool*), que significa ferramenta de desreplicação, agregação e pontuação, desenvolvida por Sieber et al. (2018). O *DAS Tool* é um método automatizado que integra um número flexível de algoritmos de categorização para calcular um conjunto otimizado de *bins* não redundantes de um único conjunto, como por exemplo: CONCOCT, MaxBin e MetaBAT. Cada um destes é baseado em diferentes recursos de agrupamento e algoritmo. Dessa maneira, Sieber et al. (2018) verificaram que utilizando diferentes ferramentas de *binning*, têm-se a recuperação de um número maior de genomas de alta qualidade do que os obtidos usando qualquer ferramenta de forma individual.

É a primeira vez que essa estratégia de recuperação de genomas a partir de metagenomas é aplicada em amostras de ambientes geotermiais da Antártica para acessar informação taxonômica e funcional. A reconstrução de genomas através de metagenomas é uma abordagem recente, onde o primeiro grande esforço foi realizado por Parks et al. (2018) com a recuperação de quase 8000 genomas microbianos de amostras disponíveis em banco de dados públicos. A partir de então, as análises metagenômicas de diferentes ambientes e tipo de amostras foram direcionadas para montagem de genomas e posterior identificação taxonômica e funcional (ALNEBERG et al., 2018; RAMOS-BARBERO et al., 2019; WILKINS et al., 2019).

Também foi utilizado o servidor online MG-RAST (*Metagenomics Rapid Annotation using Subsystem Technology*), que atua como recurso público para anotação e análise de dados de sequência metagenômica. O servidor MG-RAST realiza o controle da qualidade da sequência, armazena dados e oferece anotação em relação a vários bancos de dados de referência – taxonômica e funcional, de maneira automática e com o mínimo de informações do usuário (MEYER et al., 2008; KEEGAN et al., 2016).

A utilização de métodos dependentes e independentes de cultivo, como os descritos nos últimos tópicos, em conjunto (Figura 13) é chamada de abordagem polifásica, e tem sido importante para fornecer uma melhor compreensão das comunidades microbianas, além de uma melhor classificação, perfil de microrganismos em estudo (RAMETTE et al., 2009; RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2012) e seu potencial para uso em diferentes aplicações biotecnológicas, como a indústria petrolífera.

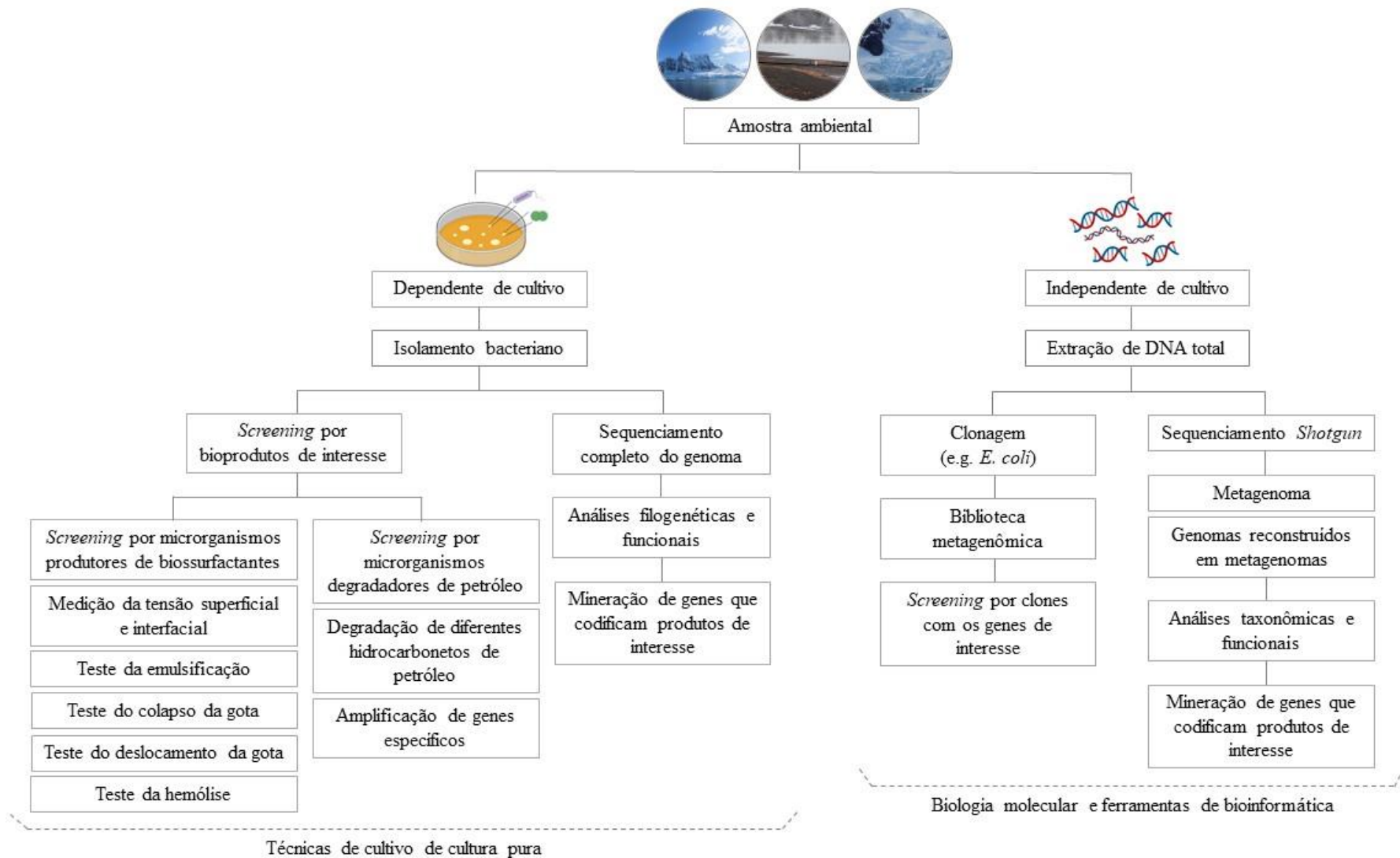


Figura 13. Representação esquemática das metodologias empregadas para a busca por microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo e produzir biossurfactante. Fonte: Autores.

2 JUSTIFICATIVA

A Antártica é conhecida por seus extremos ambientais e considerada um dos continentes mais inóspitos e severos da Terra, em consequência das suas condições climáticas. Também é conhecida como o continente de superlativos, devido às temperaturas negativas, baixa disponibilidade de água e nutrientes, alta salinidade, intensa radiação, ciclos de congelamento e degelo, longos períodos de ausência de luz, entre outros. Além disso tudo, a Antártica é considerada um mosaico de extremos, apresentando diferentes *habitats* e características singulares devido à suas condições ambientais severas. Apesar de seus ecossistemas predominantemente frios, a Antártica abriga vulcões ativos, como por exemplo, a Ilha Deception.

A Ilha Deception é uma ilha vulcânica polar que apresenta atividade geotermal contínua e visível por meio da emissão gasosa constante das fumarolas, que podem alcançar temperatura acima de 100°C. Isto contrasta com a presença de geleiras e neve que cobrem cerca de 60% da Ilha, com temperaturas abaixo do ponto de congelamento. Esses *habitats* são regiões únicas na Terra, permitindo a coexistência de psicrófilos, mesófilos, termófilos e hipertermófilos, que interagem no mesmo ambiente devido às variações pronunciadas das características físico-químicas do local.

Assim, as diferentes características ambientais da Ilha Deception permitiram moldar a biota existente no local e favoreceram comunidades microbianas versáteis e metabolicamente diversas, fazendo de Deception um habitat único para estudo da comunidade microbiana extrema e do seu potencial taxonômico e metabólico, pois fornecem condições únicas capazes de selecionar uma grande variedade de adaptações microbianas, tornando-as fornecedoras de novas espécies e produtos biotecnológicos. Entretanto, a diversidade taxonômica e funcional de comunidades microbianas tem sido explorada em uma grande variedade de ambientes antárticos. Contudo, estudos relacionados à diversidade microbiana em sistemas geotermais antárticos ainda são muito escassos e quase inexistentes visando a bioprospecção do potencial biotecnológico de microrganismos termófilos da Antártica.

Os termófilos apresentam adaptações estruturais e metabólicas para se manterem ativos às condições ambientais extremas, e dessa maneira, são alvos como

fonte de bioprodutos que apresentem capacidades únicas de atividade específica em altas temperaturas, estabilidade, resistência térmica e taxas de reação mais rápidas.

Dentre as áreas que buscam por termofílicos e seus bioprodutos, como indústria farmacêutica, médica, cosmética, detergente e alimentícia, destaca-se a indústria petrolífera. Esta área de aplicação é de interesse do presente estudo, uma vez que ambientes extremos também são impactados por hidrocarbonetos de petróleo devido à exploração territorial através de centros de monitoramento, pesquisa científica e turismo, e necessitam ser biorremediados. Adicionalmente, possuem o potencial de fornecer bioprodutos que podem ser utilizados na recuperação avançada do óleo, visto que os reservatórios de petróleo estão se esgotando e se faz necessário a busca por alternativas para a máxima exploração da capacidade do reservatório.

Para se explorar o potencial biotecnológico da diversidade microbiana termofílica nos ambientes vulcânicos, pode-se utilizar diferentes abordagens. O avanço das tecnologias de sequenciamento em larga escala possibilitou o desenvolvimento de métodos independentes de cultivo capazes de revelar uma diversidade microbiana mais fidedigna à encontrada no ambiente e suas capacidades metabólicas. Também, possibilidade de mineração de informações funcionais de interesse por meio das ferramentas de biologia molecular e bioinformática. Apesar das novas tecnologias de sequenciamento de DNA aplicando abordagens baseadas em ômica, os estudos de cultivo são essenciais para avaliar as propriedades fisiológicas das células bacterianas, fornecendo informações de genomas completos e de metabolismos ativos. A combinação de ambas as abordagens, dependentes e independentes, possibilita alcançar uma visão mais abrangente sobre as interações e os papéis funcionais dos organismos presentes na comunidade.

Diante desse contexto, o presente estudo busca elucidar sobre a diversidade bacteriana termofílica presente em ambientes vulcânicos e contribuir na discussão da exploração do potencial de bactérias termofílicas na degradação de hidrocarbonetos de petróleo e na produção de biossurfactante, com a finalidade de bioprospectar para aplicação biotecnológica de biorremediação de ambientes extremos contaminados por petróleo e na recuperação avançada do óleo em reservatórios. Até o momento, nenhum outro trabalho investigou a viabilidade de extremofílicos cultiváveis entre os gradientes de temperatura proeminentes na Ilha Deception em degradar hidrocarbonetos de petróleo e produzir biossurfactante.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição e diversidade das comunidades bacterianas termofílicas presentes em ambientes geotermiais do vulcão antártico Ilha Deception, analisando o seu potencial de aplicação em processos de biorremediação e recuperação avançada do óleo por meio da bioprospecção de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo e produtoras de biossurfactante.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conduzir o levantamento e análise de documentos reportados na literatura contendo microrganismos de ambientes extremos produtores de biossurfactante com potencial aplicação biotecnológica, para: a) investigar a situação atual e sumarizar os trabalhos na área; b) reportar as principais áreas de aplicação industrial de extremófilos e seus metabólitos; c) relatar os desafios observados e quais as perspectivas futuras;
- Investigar a comunidade microbiana presente nos ambientes geotermiais de Whalers Bay e Fumarole Bay da Ilha Deception, Antártica, por meio de métodos dependentes de cultivo (isolamento) e independentes de cultivo (metagenômica *Shotgun*);
- Avaliar a capacidade de isolados termofílicos antárticos em degradar hidrocarbonetos de petróleo;
- Verificar a produção de biossurfactantes pelos isolados bacterianos degradadores de hidrocarbonetos de petróleo e testar a estabilidade dos biossurfactantes obtidos frente à alta temperatura (100°C);
- Caracterizar taxonomicamente os isolados bacterianos termofílicos degradadores de petróleo, bem como produtores de biossurfactante, através do sequenciamento parcial do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal;
- Sequenciar e analisar o genoma completo de bactérias termofílicas capazes de degradar petróleo e produzir biossurfactante;

- Analisar os metagenomas de ambientes geotermiais da Ilha Deception, Antártica, com ênfase na classificação taxonômica e nos metabolismos de degradação de hidrocarbonetos de petróleo, bem como recuperar sequências do gene *rrs* a partir dos metagenomas e comparar com as sequências do gene *rrs* das estirpes bacterianas termofílicas isoladas dos mesmos ambientes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia empregada pode ser observada na Figura 14, no qual estão esquematizados, de forma simplificada, todos os processos realizados ao longo deste trabalho e que serão detalhados nos subtópicos seguintes.

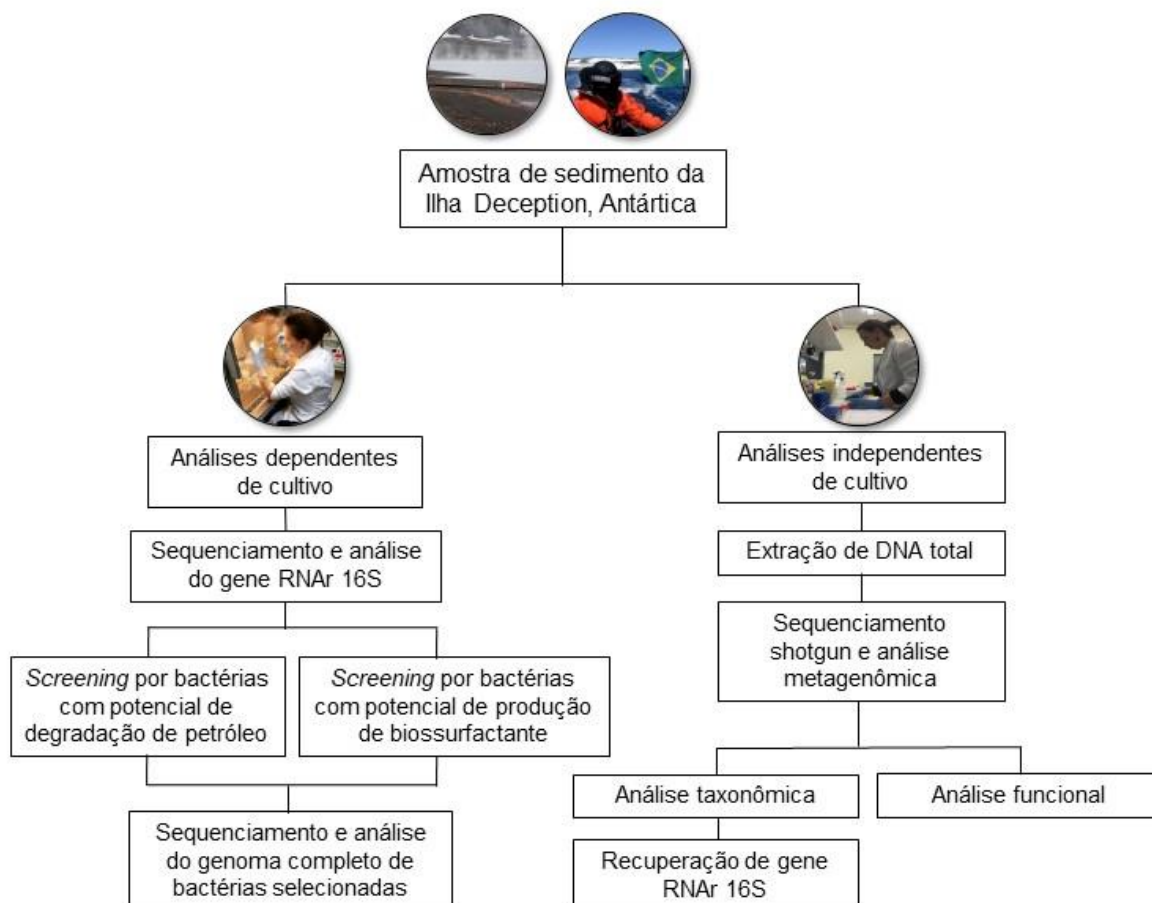


Figura 14. Fluxograma simplificado da metodologia utilizada no estudo. Fonte: Autores.

4.1 ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM

Para a busca de bactérias termofílicas, dois ambientes geotérmicos foram amostrados. Todos os pontos de coleta estão localizados na Ilha Deception, pertencente ao arquipélago Ilhas Shetland do Sul, noroeste da Península Antártica (Figura 15).

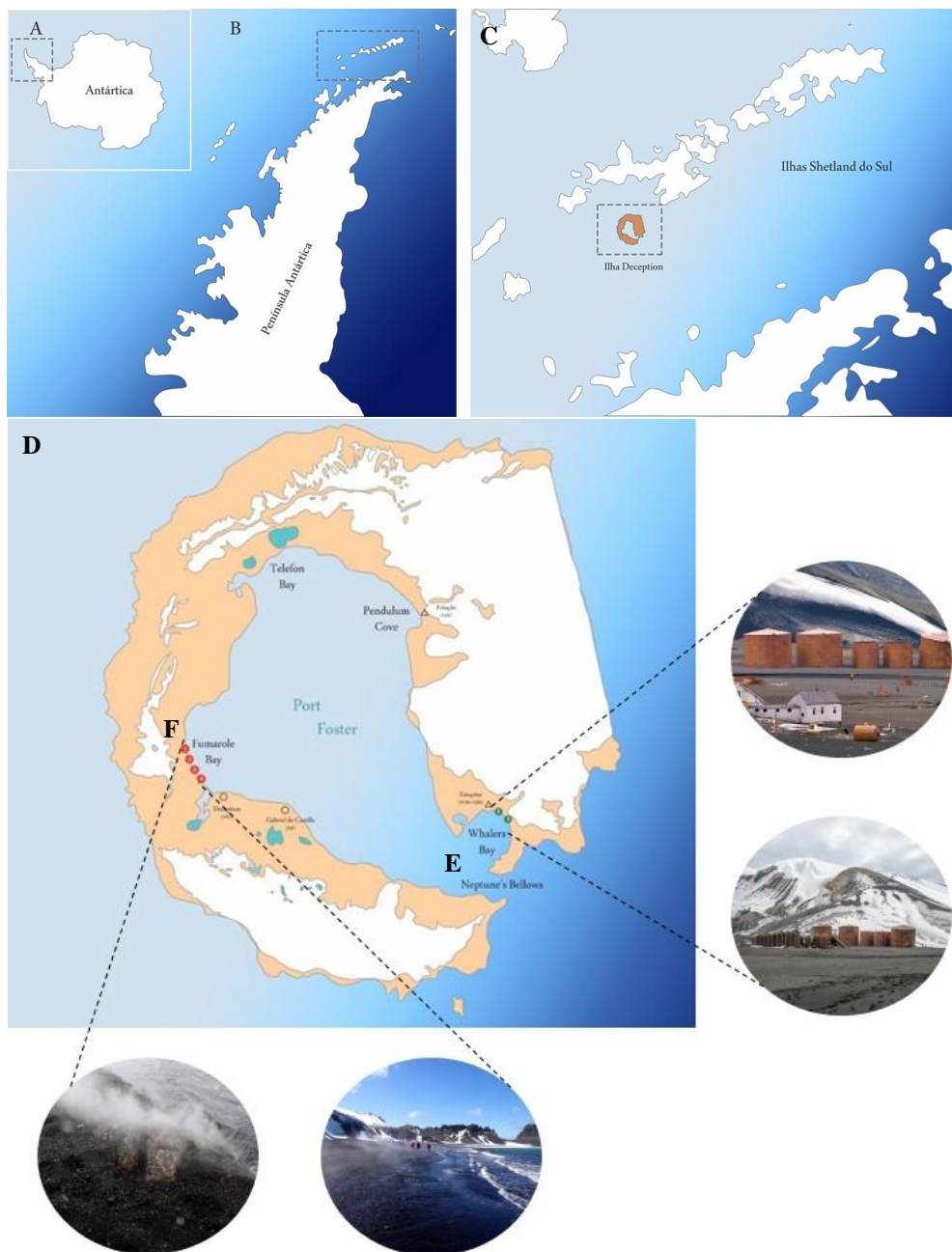


Figura 15. Esquema do continente antártico (A), enfatizando a Península Antártica (B), Ilhas Shetland do Sul (C) e Ilha Deception (D), bem como indicando os pontos de amostragem Em Whalers Bay (E) e Fumarole Bay (F). Fonte: Autores.

As coletas foram realizadas nos sítios geotérmicos de Whalers Bay e Fumarole Bay, localizados na Ilha Deception. Whalers Bay se situa próximo à única entrada à ilha e baía Port Foster, e nela estão presentes os resquícios da época de exploração baleeira e as antigas estações de pesquisa da Grã-Bretanha e Noruega. Enquanto em Fumarole Bay, estão presentes as duas bases de pesquisa científica que se encontram ativas, da Argentina e Espanha.

Os locais foram amostrados no verão austral de 2013/2014, 2015/2016 e de 2016/2017, nas operações Antárticas (OPERANTAR) XXXII, XXXIV e XXXV. Na Tabela 1 pode-se observar os sítios geotérmicos amostrados e as características de cada ponto amostral.

Tabela 1. Relação das amostras coletadas em diferentes locais da Península Antártica.

Operação PROANTAR	Ambiente geotermal	Código	Temperatura local	Uso / análise
XXXV	Whalers Bay	WB1, WB2, WB3	67°C	Sequenciamento de <i>amplicons</i>
	Whalers Bay	WB4, WB5, WB6	50°C	
	Fumarole Bay	FB1, FB2, FB3	110°C	
	Fumarole Bay	FB4, FB5, FB6	112°C	
	Fumarole Bay	FB7, FB8, FB9	85°C	
XXXIV	Whalers Bay	WB1	50°C	Cultivo de bactérias termofílicas, bioprospecção e análises genômicas
	Whalers Bay	WB2	60°C	
	Fumarole Bay	FB1	55°C	
	Fumarole Bay	FB2	70°C	
	Fumarole Bay	FB3	80°C	
XXXII	Fumarole Bay	FB4	100°C	Sequenciamento de metagenomas
	Whalers Bay	WBA1, 2, 3	54°C	
	Whalers Bay	WBB1, 2, 3	10°C	
	Whalers Bay	WBC1, 2, 3	0°C	
	Fumarole Bay	FBA1, 2, 3	98°C	
	Fumarole Bay	FBB1, 2, 3	66-80°C	
	Fumarole Bay	FBC1, 2, 3	0°C	

Em cada ponto de amostragem, aproximadamente 500 g de sedimento (0-5 cm de profundidade) foram coletados e transferidos para sacos plásticos (Whirl Pack®) estéreis. O material coletado foi imediatamente estocado e acondicionado em duas temperaturas diferentes, mediante à sua finalidade. As amostras destinadas para análise molecular foram mantidas em ultrafreezer a -80°C e as amostras para a realização de cultivo foram acondicionadas em geladeira a 4°C.

As amostras utilizadas neste trabalho foram coletadas durante a OPERANTAR e contou com apoio logístico do Navio Polar Almirante Maximiano, Marinha do Brasil

e com auxílio do projeto MICROSFERA, coordenado pela Dra. Vivian Helena Pellizari da Universidade de São Paulo (USP).

4.2 CULTURA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS TERMOFÍLICAS ANTÁRTICAS

Após a coleta e transporte das amostras, da Antártica para o Brasil, as amostras foram mantidas a 4°C na geladeira do Laboratório de Ecologia Microbiana e Molecular (LEMM) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), para posterior cultura e isolamento de bactérias termofílicas.

As amostras de sedimento dos diferentes pontos amostrados foram homogenizadas e 10 g foram transferidas para um Erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina (0,85%) e 5 g de pérolas de vidro, e agitadas em shaker por 2 horas. Posteriormente foi realizada diluição seriada (1:10), de 10^{-1} a 10^{-3} , em tubos Eppendorf contendo 900 µL de solução salina estéril, para em seguida realizar o plaqueamento pela técnica de *spread plate*. Foi realizado em duplicata, com placas de Petri contendo seis diferentes meios de cultura sólido: Lysogeny broth, Marine Agar, Glicose Yeast Malte, meio heterotrófico para *Bacillus* - DSMZ 260, Fitato de cálcio e National Botanical Research Institute's phosphate. A descrição dos meios se encontra no Quadro 1.

Quadro 1. Meios de cultura utilizados e a descrição e quantidade dos componentes.

Meio de cultura	Componentes do meio
Lysogeny broth (LB) (BERTANI, 1951)	<ul style="list-style-type: none"> • Extrato de levedura – 5 g • Triptona – 10 g • NaCl – 10 g • Acréscimo de 15 g de ágar bacteriológico para o meio sólido • Para 1000 mL de água destilada
Marine Agar - Difco 2216 (MA) (ZOBELL, 1941)	<ul style="list-style-type: none"> • Peptona – 5 g • Extrato de levedura – 1 g • Citrato férrico – 0,1 g • Cloreto de magnésio – 8,8 g • Sulfato de sódio – 3,24 g • Cloreto de cálcio – 1,8 g • Cloreto de potássio – 0,55 g • Bicarbonato de sódio – 0,16 g • Brometo de potássio – 0,08 g

	<ul style="list-style-type: none"> • Cloreto de estrôncio – 34 mg • Ácido bórico – 22 mg • Silicato de sódio – 4 mg • Fluoreto de sódio – 2,4 mg • Nitrato de amônio – 1,6 mg • Fosfato dissódico – 8 mg • Ágar bacteriológico – 15 g • Para 1000 mL de água destilada
Glucose Yeast Malt (GYM) (MENDEZ et al., 1985)	<ul style="list-style-type: none"> • Glicose – 4 g • Extrato de levedura – 4 g • Extrato de malte – 10 g • Carbonato de cálcio – 2 g • Ágar – 12 g • Para 1000 mL de água destilada
Meio heterotrófico para <i>Bacillus</i> (DSMZ* 260) * Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.	<ul style="list-style-type: none"> • Na₂HPO₄ x 2 H₂O – 4 g • KH₂PO₄ – 1,5 g • NH₄Cl – 1g • MnSO₄ x H₂O – 0,01 g • MgSO₄ x 7 H₂O – 0,2 g • CaCl₂ x 2 H₂O – 0,01 g • Citrato de amônia férrica – 5 mg • Solução traço SL-6 – 3 mL • Piruvato sódico – 1,5 g • Para 1000 mL de água destilada
Fitato de cálcio (RICHARDSON et al., 2001)	<ul style="list-style-type: none"> • Glicose – 10 g • (NH₄)₂SO₄ – 0,5 g • KCl – 0,2 g • MgSO₄ x 7 H₂O – 0,1 g • Fitato de cálcio – 2 g • Extrato de levedura – 0,5 g • MnSO₄ – 0,005 g • FeSO₄ – 0,005 g • Ágar bacteriológico – 1,5 g • Para 1000 mL de água destilada
National Botanical Research Institute's phosphate (NBRIP) (NAUTIYAL, 1999)	<ul style="list-style-type: none"> • Glicose – 10 g • Fosfato de cálcio – 5 g • MgCl₂ x 6 H₂O – 5 g • MgSO₄ x 7 H₂O – 0,25 g • KCl – 0,2 g • (NH₄)₂SO₄ – 0,1 g • Ágar bacteriológico – 1,5 g • Azul de bromofenol – 0,025 g • Para 1000 mL de água destilada

As placas e frascos foram incubados por 48 h em estufa a 55°C e realizada a contagem de colônias formadas em cada placa, seguida do esgotamento a fim de

purificar o isolado. A pureza das culturas foi verificada por meio da homogeneidade do morfotipo e pela técnica de coloração de Gram.

As colônias isoladas e puras foram armazenadas em criotubos contendo 20% v/v^{-1} de glicerol a -80°C , para fins de estocagem. Estes estão incluídos na Coleção de Bactérias Antárticas do LEMM, possuindo código, descrição morfológica, informações de cultivo e de coleta.

4.2.1 Identificação molecular dos isolados Antárticos

Com a finalidade de identificar os isolados bacterianos termofílicos da ilha vulcânica Deception, estes foram submetidos à amplificação e sequenciamento das regiões de DNA codificadoras de RNA ribossomal 16S (gene *rrs*).

Os isolados foram reativados do estoque de glicerol em meio caldo LB a 55°C , por 48 h e sob agitação constante. As culturas tiveram seu DNA genômico extraído utilizando o kit comercial para isolados Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA, USA), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. Após extração, o DNA foi quantificado usando o kit Qubit® 2.0 Fluorometer dsDNA (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) e sua qualidade avaliada em gel de agarose 1% contendo DNA SYBR® Safe DNA gel Stain da Life Technologies™, e visualizado por transluminação de luz ultravioleta.

Os iniciadores 27f (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3') e 1492r (5'-GTT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (LANE, 1991) foram utilizados para a amplificação do gene que codifica a subunidade do RNAr 16S. A reação de PCR foi realizada em volume final de 25 μL , contendo 1 μL de BSA (1:20), 1 μL de cada primer (27f e 1492r a 10pM), DNA na concentração de 10 ng, 12,5 μL de MyTaq® (Bioline) que continha tampão, dNTPs, MgCl_2 e enzima DNA polimerase. A amplificação foi realizada em termociclador com um ciclo de desnaturação inicial de 3 min a 95°C , seguidos de 25 ciclos de 30 seg a 95°C , 30 seg a 55°C e 30 seg a 72°C ; um ciclo final de extensão por 5 min a 72°C .

Os produtos de PCR foram purificados com o kit SureClean Plus (Bioline GmbH), de acordo com recomendações do fabricante, posteriormente quantificado com Qubit 4.0 e Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, USA) e a integridade

do *amplicon* verificada em gel de agarose 1.5% em tampão TBE 0,5X e corados com brometo de etídio e visualizado em luz UV.

Após purificação, aproximadamente 25 ng do produto de PCR de cada isolado foi enviado para sequenciamento Sanger, realizado com os primers 27f e 1492Rr.

4.2.1.1 Análises das sequências

O processamento das sequências obtidas do sequenciamento foi realizado no programa Geneious Prime (www.geneious.com), no qual a qualidade das sequências foi checada, trimadas e a montagem das sequências de alta qualidade de cada isolado foram realizadas. Todos os isolados sequenciados foram depositados no banco de dados do SRA do NCBI (*Sequence Read Archives – National Center for Biotechnology Information*) obtendo número de depósito e informações de coleta e isolamento.

As sequências reunidas foram comparadas com todas as sequências de DNA depositadas no banco de dados do Silva v.132 (QUAST et al., 2013), considerando a maior homologia entre a sequência obtida e as sequências depositadas como indicador na identificação molecular das espécies.

4.3 SCREENING POR BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO E PRODUTORAS DE BISSURFACTANTE

4.3.1 Screening de bactérias degradadoras de petróleo

Para selecionar bactérias com potencial em degradar hidrocarbonetos de petróleo para uso desse carbono como fonte de energia e nutrição, 100 isolados bacterianos termofílicos previamente cultivados, identificados e depositados na Coleção foram reativados do estoque de forma aleatória.

Em câmara de fluxo laminar foi retirada uma alíquota de 3 µL da amostra do criotubo e transferida para um tubo de falcon contendo 5 mL de meio de cultura LB a 55°C por 48 h. Testou-se o grau de pureza e em seguida uma alíquota de 100 µL da cultura de cada isolado selecionado foi transferida para placas contendo meio Bushnell-Haas (BH) sólido com adição de 2% de óleo cru (Tabela 2).

Tabela 2. Composição do meio mineral Bushnell-Haas (BH) e do óleo cru (petróleo Marlim P-47).

Componentes	Concentração	Fonte
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,02 g L ⁻¹	
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g L ⁻¹	
K ₂ HPO ₄	1 g L ⁻¹	Atlas (1995)
KH ₂ PO ₄	1 g L ⁻¹	
NH ₄ NO ₃	1 g L ⁻¹	
FeCl ₃ x 2 H ₂ O	0,05 g L ⁻¹	
	11,6	
Fator KUOP	(petróleo predominantemente naftênico e aromático)	Cedido pela Petrobras

Os isolados que apresentaram crescimento em placa com meio BH suplementado com óleo foram enriquecidos em tubos com 5 mL de caldo BH suplementado com extrato de levedura (2%) a 55°C por 48 h. Em seguida, os isolados selecionados foram submetidos ao teste da gota, conforme descrito por Youssef et al. (2004).

Para tanto, as células foram centrifugadas e ressuspensas em solução salina três vezes sequencialmente, a fim de retirar qualquer resquício de fonte de carbono remanescente no meio. As células foram ressuspensas em 5 mL de solução salina e inoculadas em poços de placas de cultivo contendo 24 poços por placa, no qual cada poço foi adicionado 2 mL do meio BH, 1 gota de óleo cru (aproximadamente 20 µL) e 160 µL de cada isolado, nessa ordem.

Todas as inoculações foram realizadas em triplicata, incluindo os controles negativo e positivo, e incubadas a 55°C, com observação por até 21 dias. Diariamente as placas foram monitoradas para visualizar a evaporação do meio devido à alta temperatura da estufa. Resultados foram considerados positivos quando houve mudança no aspecto do óleo (Figura 16).

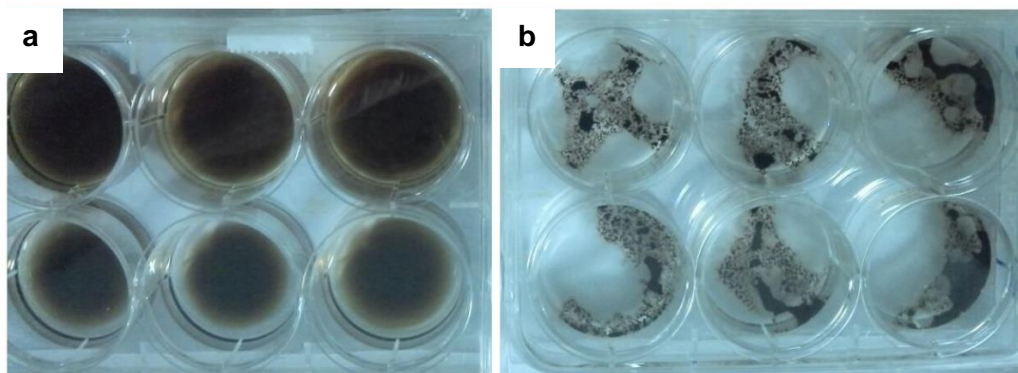


Figura 16. Exemplo de placa do teste da gota mostrando culturas testadas individualmente em triplicata; a) Controle negativo, sem inóculo bacteriano; b) Controle positivo para degradação.

Esse teste foi realizado para avaliar de forma qualitativa a degradação do óleo pelos isolados bacterianos e para selecionar os que seriam utilizados para o screening de bactérias produtoras de biossurfactante, com base nos resultados mais significativos quando comparados aos controles.

4.3.2 Screening de bactérias termofílicas produtoras de biossurfactante

Com o intuito de verificar a capacidade dos isolados termofílicos em produzirem biossurfactante foi realizado o *screening* em 50 isolados da Coleção com diferentes técnicas, tais como: teste da espuma, teste da hemólise, teste do colapso da gota, teste de deslocamento da gota, teste de emulsificação (E24) e o teste da estabilidade da emulsificação em alta temperatura. Todas as metodologias empregadas estão descritas a seguir.

Os isolados foram reativados do estoque em caldo LB, a 55°C por 48h e agitação constante, e então foram utilizados para o preparo do inóculo e obtenção do sobrenadante de cada isolado. Este foi obtido pelo cultivo de cada isolado, em triplicata, em Erlenmeyers com volume final de 150 mL de caldo Bushnell-Haas suplementado com 2% de extrato de levedura, e incubados em shaker a 55°C, por 7 dias a 165 rpm (MANI et al., 2016). Após o crescimento, 1 mL de cada amostra passou por centrifugação durante 15 minutos a 13.000xg e seu sobrenadante foi utilizado na realização dos ensaios de *screening*.

4.3.2.1 Teste da produção de espuma

A produção de espuma é um indicativo da presença de biossurfactante. O teste é simples e auxilia na confirmação da presença de biossurfactante quando realizado em conjunto com outras metodologias (ATUANYA et al., 2016). O resultado foi observado após o preparo do inoculo, por meio da agitação dos Erlenmeyers por 30 segundos. É considerado um resultado positivo quando após a agitação ocorrer a formação de espuma e é interpretado como negativo quando houver ausência de espuma.

4.3.2.2 Teste da hemólise

Para verificar a produção de hemólise, 10 µL do sobrenadante de cada cultura crescida foi inoculado em forma de spots em placas contendo o meio sólido Agar Sangue (sangue desfibrinado de carneiro a 5% - Laborclin®), assim como os controles positivo (10 µL de SDS a 1%) e negativo (10 µL água destilada) (MULLIGAN et al., 1984). As placas foram incubadas por 48 h a 55°C e após o período de incubação, na presença de halo transparente (zona de hemólise), o resultado é positivo para produção de biossurfactante.

4.3.2.3 Teste do colapso da gota

Em uma lâmina de vidro, uma gota de óleo cru e 10 µL do sobrenadante centrifugado de cada isolado foram adicionados, assim como os controles positivo (SDS 1%) e negativo (água destilada). Na presença do biossurfactante, a gota do sobrenadante tenderá a se espalhar sobre a superfície oleosa devido à redução da tensão superficial do líquido, enquanto em resultado negativo, a gota permanece estável e sem apresentar nenhuma mudança em sua forma côncava. O resultado foi observado em até um minuto após a realização do teste, conforme recomendação de Jain et al. (1991).

4.3.2.4 Teste do deslocamento do óleo

Outra metodologia que fornece informação sobre a ação tensoativa no *screening* por bactérias produtoras de biossurfactante é o teste do deslocamento na gota, descrito por Morikawa et al. (2000). Para o teste, 10 µL de óleo cru foram adicionados em uma placa de Petri contendo 40 mL de água destilada, formando uma fina camada de óleo. Em seguida, 10 µL do sobrenadante de cada isolado e controles positivo (SDS 1%) e negativo (água) foram adicionados no centro da camada de óleo. Na presença de biossurfactante, o óleo é deslocado e torna-se possível observar a formação de zona circular de cor mais clara. O diâmetro da zona circular é mensurada (Figura 17).

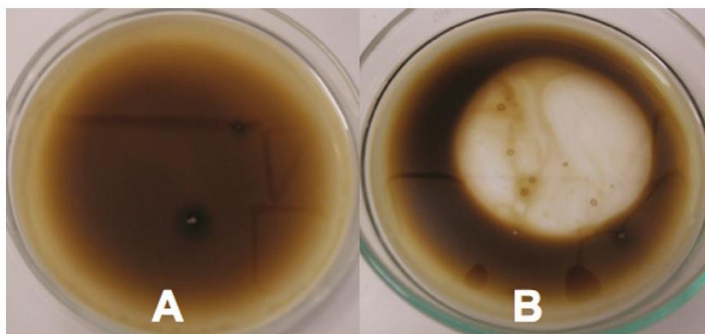


Figura 17. Ilustração dos resultados negativo (A) e positivo (B) no teste de deslocamento do óleo. Fonte: Silva et al. (2014).

4.3.2.5 Teste da emulsificação (E24)

O teste de emulsificação seguiu o protocolo proposto por Wei et al. (2005), utilizando óleo cru e diesel. Toda a vidraria teve que estar estéril e livre de qualquer resíduo para que não houvesse comprometimento dos resultados.

Foram transferidos 200 µL do sobrenadante de cada isolado para um tubo de vidro contendo 600 µL de água destilada e 1,2 mL de óleo cru ou diesel. O tubo contendo a mistura de sobrenadante-água-óleo foi agitado por 2 minutos em vórtex e os resultados foram analisados após 24 horas. O mesmo procedimento foi realizado com os controles (SDS a 1% e água destilada).

Para o cálculo do índice de emulsificação a seguinte equação foi utilizada (Equação 1):

$$IE (\%) = \frac{\text{Altura da camada emulsificada (mm)}}{\text{Altura total da camada líquida (mm)}} \times 100 \quad (1)$$

De acordo com Sneha et al. (2012), o índice E24 corresponde à estabilidade da emulsificação produzida após 24 horas. Um exemplo de resultado do teste de emulsificação (E24) pode ser observado na Figura 18.

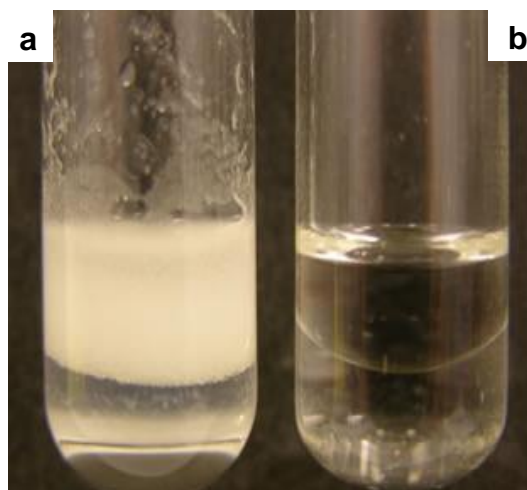


Figura 18. Ilustração dos resultados positivo (a) e negativo (b) no teste de emulsificação. Fonte: Adaptado de Gutierrez e Banat (2015).

4.3.2.6 Teste da estabilidade do biossurfactante a alta temperatura

Com o objetivo de verificar a resistência e a estabilidade do biossurfactante frente ao calor, o sobrenadante de cada isolado foi aquecido a 100°C por 15 minutos (COUTO et al., 2015) e em seguida, submetidos ao teste de emulsificação (E24) com óleo cru e diesel, conforme descrito no subtópico 4.2.2.5.

4.4 ANÁLISES GENÔMICAS DE BACTÉRIAS TERMOFÍLICAS DA ANTÁRTICA

O sequenciamento completo do genoma de 22 isolados bacterianos termofílicos foi realizado em plataforma Illumina Miseq, com o kit NEBNext Ultra II FS DNA para montagem da biblioteca, seguindo o protocolo do fabricante para um *input* de DNA inferior a 100 ng. Para tanto, primeiramente foi realizado o fingerprint com T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) a partir do RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA* a partir da PCR) a fim de selecionar os isolados.

Foram utilizados 10 ng de DNA de cada isolado para reação de PCR com 17,5 µL de solução contendo MM HotStar Taq+ e primer AAWZS (10 pmol/µ) marcado com FAM. Os produtos de PCR foram observados em eletroforese em gel agarose 1,8% e 1X TBE, corados com brometo de etídio e visualizados em luz UV. Após, realizou-se a purificação com o kit NucleoSpin® Gel, o fragmento recuperado foi quantificado com Qubit dsDNA HS assay, calculado o volume de formamida para cada amostra (5 ng/uL), precipitado com etanol e então submetido à análise de T-RFLP no equipamento *Fragment Analyzer* (MapMaker 1500 e duas corridas: fragmento longo e curto). O resultado dos fragmentos serviu de base para a escolha dos isolados a serem sequenciados.

O preparo das 22 amostras para o sequenciamento consistiu em diferentes etapas. Primeiramente o DNA genômico foi fragmentado enzimaticamente em tamanhos de 300 a 700 pb, seguido da ligação dos adaptadores Illumina e purificação do DNA com *beads* magnéticos *AMPure*. O INDEX-PCR foi realizado com os primers i7 (Index primer) e i5 (primer de PCR universal) em um programa de PCR com um ciclo de desnaturação inicial de 98°C por 30 seg, 5 ciclos a 98°C por 10 seg, 65°C por 75 seg e um ciclo de 65°C por 5 min. O DNA com os adaptadores e index foram purificados novamente com *AMPure beads* e o tamanho dos fragmentos foram avaliados em Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) e *chip* Bioanalyzer DNA 1000 (Agilent Technologies) (Figura 19).

Em seguida, foi realizado PCR quantitativo com o kit JetSeq™ Library Quantification Lo-ROX (Bioline) nas diluições 1:10.000 e 1:100.000 e após cálculos, a biblioteca de cada isolado foi normalizada para concentração de 4 nM. Todas as bibliotecas diluídas foram colocadas em um único eppendorf (*pooling*) e então o DNA foi desnaturado com NaOH e adicionado 5% do controle interno PhiX devido à baixa complexidade (pouca variação de bases).

O sequenciamento foi realizado na plataforma MiSeq juntamente com os reagentes e *flow cell* MiSeq v3, que gera *reads* de 301 pb, *paired-end*, por um total de 600 ciclos de amplificação. O sequenciamento foi acompanhado por 65 horas até seu término, pela plataforma online BaseSpace® (Illumina).

Após o sequenciamento, os *reads* foram filtrados utilizando o software Sickle (JOSHI; FASS, 2011) com um mínimo de *Phred score* de 30, e em seguida, os *contigs* foram montados com o programa SPAdes 3.10.1 (BANKEVICH et al., 2012) e sua

completude e contaminação foram avaliadas com as ferramentas CheckM e RefineM (PARKS et al., 2015). Posteriormente, os *contigs* foram anotados no servidor online RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (AZIZ et al., 2008) e PGAP (*Prokaryotic Genome Annotation Pipeline*) do NCBI (TATUSOVA et al., 2016).

Para a escrita dos artigos de genomas apresentados na presente tese, apenas dois genomas foram utilizados do montante, e os dados foram depositados no banco de dados GenBank do NCBI sob os números de acesso VKJN000000000 e VKJO000000000. Os *reads* obtidos no sequenciamento Illumina para estes genomas estão disponíveis nos números de acesso SRR10040619 e SRR10040620.

4.5 ANÁLISE METAGENÔMICA DE AMBIENTES GEOTERMAIS DA ANTÁRTICA

Metagenômica é uma ferramenta que amplifica o DNA total de amostras ambientais. Assim, todos os genes de todos os organismos da comunidade microbiana presente são detectados, e pode-se inferir a taxonomia, bem como a funcionalidade destes no ambiente.

4.5.1 Obtenção de sequências

4.5.1.1 Extração de DNA total das amostras da Ilha Deception

O DNA total foi extraído diretamente das 18 amostras de solo dos sítios geotérmicos (vide Tabela 1), utilizando kit comercial PowerMax Soil™ DNA (MoBio, USA), que fez uso de 10 g de cada amostra e seguiu-se o protocolo do fabricante. Posteriormente, o DNA foi purificado com o kit *OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit™* (Zymo Research, USA), conforme o protocolo do fabricante. Em seguida, a integridade do DNA extraído e purificado foi observada por meio de eletroforese em um gel de agarose 1% em gel e 1X tampão TAE e a concentração de DNA de cada amostra foi determinada usando o fluorímetro Qubit® e kit Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, USA). Adicionalmente, a fim de obter mais material genômico para o sequenciamento metagenômico *Shotgun*, uma vez que as concentrações foram baixas, foi realizada a concentração em 20X do DNA extraído com Amicon® Ultra 0.5 (Merck, Germany), seguindo especificações do fabricante.

4.5.1.2 Sequenciamento metagenômico Shotgun

A obtenção dos dados metagenômicos foi realizado através da colaboração com a Prof. Dra. Vivian H. Pellizari, do Instituto Oceanográfico da USP.

O sequenciamento dos 18 metagenomas (6 amostras em triplicata) foi realizado em plataforma Illumina HiSeq 2500, em um sistema *paired* 2 x 100 pb em 3 *lanes*, totalizando aproximadamente 30 milhões de *reads* por amostra. O sequenciamento foi conduzido no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida, Unicamp.

Primeiramente, as amostras de DNA total foram amplificadas (*Whole Genome Amplification*) com o *kit illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification* (GE healthcare Life Sciences, EUA), seguindo o protocolo do fabricante, no intuito de obter DNA suficiente para o envio para o sequenciamento. Aproximadamente 2 µg de DNA foram obtidos e purificados com *beads* magnéticas (*AMPure XP beads*). Em seguida, o DNA purificado foi encaminhado ao Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida, da Unicamp, Campinas – Brasil, onde as bibliotecas foram preparadas e o sequenciamento realizado em plataforma Illumina HiSeq.

4.5.2 Análise taxonômica

A análise taxonômica ocorreu utilizando-se de duas ferramentas distintas: a recuperação de genomas a partir de metagenomas, com metodologia descrita nos tópicos 4.5.2.1 e 4.5.2.2, e pelo servidor online MG-RAST, descrito no tópico 4.5.3.

4.5.2.1 Processamento e qualidade dos reads metagenômicos da Ilha Deception

Os *reads* obtidos através da plataforma Illumina HiSeq para a análise do Metagenoma foram primeiramente filtrados utilizando o *software* SICKLE (JOSHI; FASS, 2011), utilizando um mínimo de *Phred score* de 30. O *Metagenomics RAST server* (MG-RAST) fornece um controle de qualidade das sequências, removendo sequências duplicadas e seleciona sequências de acordo com sua qualidade e

tamanho (MEYER et al., 2008). Foram selecionados os *reads* com tamanho maior que 80 pb e *Phred score* maior que 30.

Estes *reads* selecionados dos metagenomas estão depositados no servidor online MG-RAST sob os códigos de acesso mgm4670271 a mgm4670288, porém, ainda se encontram em armazenamento privado por não terem sido publicados até o momento, ficando disponíveis apenas para os que possuem acesso aos metagenomas.

4.5.2.2 Recuperação de genomas montados a partir dos metagenoma (MAGs) e atribuição de taxonomia

Os reads filtrados das amostras da Ilha Deception foram montados utilizando a ferramenta MetaSPAdes (NURK et al., 2017), um montador *de novo*, utilizando os parâmetros padrão.

Após a montagem dos *reads*, os *bins* procarióticos foram recuperados utilizando-se da ferramenta *DAS tool* (SIEBER et al., 2018), usando parâmetros indicados pelos desenvolvedores. Os métodos de *binning* usados nessa abordagem foram CONCOCT (ALNEBERG et al., 2014), MaxBin2 (WU et al., 2015) e MetaBAT (KANG et al., 2015), e posteriormente refinados no *DAS tool*. A avaliação da qualidade dos *bins* recuperados, incluindo a estimativa de integridade e contaminação, foi realizada com CheckM (função “lineage_wf”) (PARKS et al., 2015).

Neste estudo, um *bin* procariótico foi definido como um MAG de acordo com a definição proposta por Parks et al. (2018), no qual uma pontuação do *bin* é calculada subtraindo a taxa de integridade cinco vezes a taxa de contaminação. *Bins* com uma pontuação resultante acima de 50 foram considerados MAGs.

A taxonomia dos diferentes MAGs obtidos foi atribuída utilizando o *Genome Taxonomy Database* (GTDB), versão 0.2.2 (PARKS et al., 2018).

4.5.3 Análise taxonômica e funcional dos metagenomas da Ilha Deception pelo servidor online MG-RAST

Para os metagenomas da Ilha Deception, também foi realizado a anotação por meio do servidor online MG-RAST.

Os *reads* filtrados, conforme descrito previamente no tópico 4.5.2.1, foram anotados com a versão 3.3 do pipeline do MG-RAST. Os perfis funcionais e taxonômicos foram gerados através das classificações de subsistemas e classificações com melhor *hit*, por meio do SEED *subsystem* e M5NR (*Non-redundant protein database*) (WILKE et al., 2012) e KEGG, disponíveis no MG-RAST.

Foi gerada uma tabela contendo a frequência de *hits* para cada taxa individual (taxonomia) ou subsistema (função) para cada Metagenoma. Os valores foram normalizados para abundância relativa para remover possíveis vieses quanto aos diferentes tamanhos dos *reads* e esforços de sequenciamento. Para o presente trabalho, para análise funcional, selecionou-se apenas os dados vinculados ao metabolismo de degradação de compostos aromáticos.

4.5.4 Recuperação do gene *rrs* dos metagenomas da Ilha Deception

Objetivando a comparação entre as informações do gene *rrs* obtidas do cultivo de isolados termofílicos da Ilha Deception, foi realizado a recuperação do gene *rrs* dos 18 metagenomas antárticos utilizando o software MATAM (*Mapping-Assisted Targeted-Assembly for Metagenomics*) (PERICARD et al., 2018). De acordo com os autores, esta ferramenta reconstrói genes marcadores filogenéticos de interesse a partir de sequências curtas de metagenomas *Shotgun* e utiliza banco de dados de referência para identificação taxonômica, com um limite de identidade de 95%. Para melhor entender as análises empregadas no software MATAM, este está esquematizado de forma simplificada na Figura 19.

As sequências obtidas pelo MATAM foram reunidas e comparadas com as sequências de DNA depositadas no banco de dados do Silva v.132 (QUAST et al., 2013), conforme descrito no tópico 4.2.1.1.

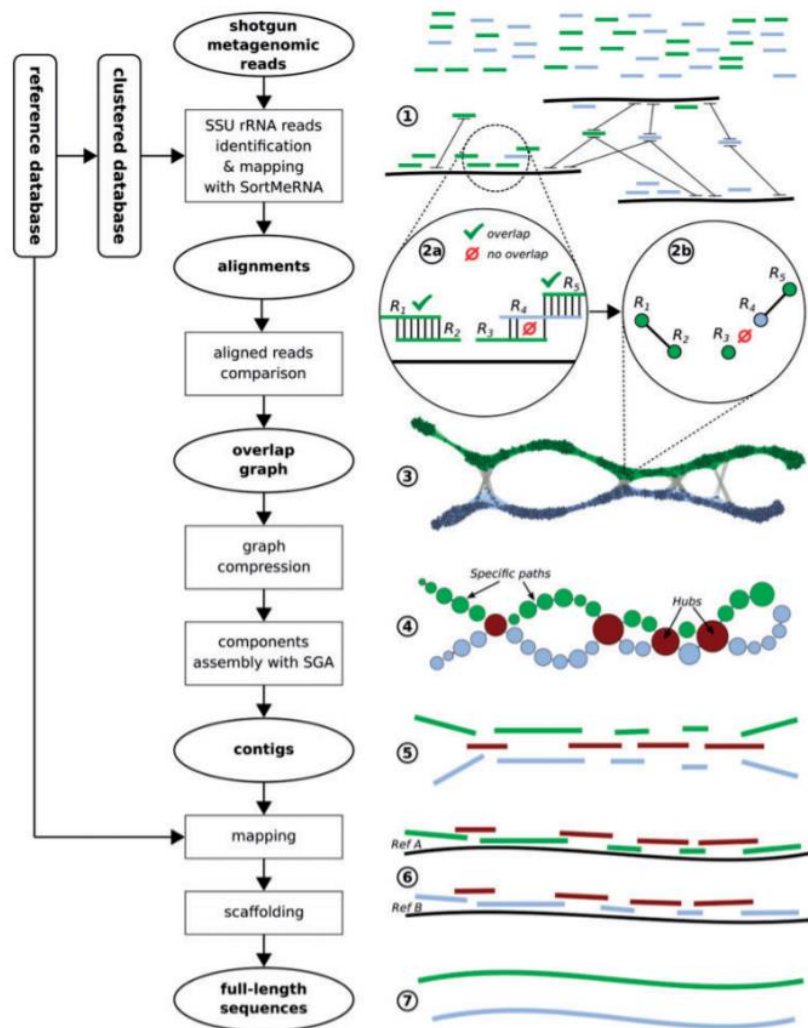


Figura 19. Visão geral do software MATAM, apresentando as principais etapas do pipeline (esquerda) e ilustração das etapas quando a amostra possui duas espécies (direita). Por meio dos *reads* metagenômicos provenientes do sequenciamento shotgun, é realizado primeiramente a identificação dos reads de rRNA SSU e é feito o alinhamento em até 10 sequências a partir de um banco de dados de referência em cluster (1). Os alinhamentos são comparados entre eles para calcular *reads* alinhados em pares (2a). Uma sobreposição com 100% de identidade entre dois *reads* corresponde a uma borda (2b) no gráfico de sobreposição dos *reads* (3). Utilizando uma pesquisa por amplitude, o gráfico de sobreposição é então simplificado em um gráfico compactado e subgráficos (*hubs*, caminhos específicos, *singletons*) são identificados (4). Os *reads* de cada subgráfico são montados em *contigs* com SGA (montador genômico *de novo* usando gráficos de strings) (5). *Contigs* são alinhados no banco de dados de referência completo (6). *Contigs* alinhados na mesma referência são utilizados para construir scaffold e apenas os com comprimento maior de 500 bp são retidos (7). A última etapa consiste em estimar as abundâncias ao remapear rRNA reads nos scaffolds, e atribuindo a esse scaffold a um táxon usando o classificador RDP. Fonte: Pericard et al. (2018).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tópico de resultados e discussão desta tese de doutorado está separado em capítulos, no qual o capítulo I foi escrito pela necessidade de um material de revisão para dar suporte na condução do presente trabalho. Os capítulos II, IV e V são dados inéditos resultantes do delineamento experimental da presente tese.

- Capítulo I é um artigo de revisão aceito para publicação em 2019 na revista *Extremophiles* (IF: 2.046), intitulado “*Extreme environments: A source of biosurfactant for biotechnological applications*”.
- Capítulo II é um artigo a ser submetido à revista *Systematic and Applied Microbiology* (IF: 2.808), intitulado “*Polyphasic analysis reveals petroleum hydrocarbon degradation and biosurfactant production of non-dominant thermophilic bacteria from Deception Island, an Antarctic volcano*”.
- Capítulo III é composto por dois artigos aceitos para publicação em 2019 na revista *Microbiology Resource Announcements*, intitulados “*Draft-genome Sequence of Geobacillus sp. strain LEMMJ02, a thermophile isolated from an Antarctic volcano*” e “*Draft-genome Sequence of Brevibacillus sp. strain LEMMJ03 isolated from an Antarctic volcano sediment*”.
- Capítulo IV é um capítulo no formato tradicional de resultados e discussão de dados gerados durante a presente tese, resultante da análise de metagenomas da Ilha Deception, Antártica.

5.1 CAPÍTULO I

EXTREME ENVIRONMENTS: A SOURCE OF BIOSURFACTANT FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

Júnia Schultz and Alexandre Soares Rosado*

Laboratory of Molecular Microbial Ecology, Institute of Microbiology Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

*Corresponding author

Alexandre Soares Rosado

Institute of Microbiology Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ)
Av. Carlos Chagas Filho, 373, CCS, Bloco E Subsolo, Ilha do Fundão, 21941-902, Rio de Janeiro, Brazil

Telephone: +55 21 2560-8028

e-mail: asrosado@micro.ufrj.br

Abstract

The surfactant industry moves billions of dollars a year and consists of chemically synthesized molecules, usually derived from petroleum. Surfactant is a versatile molecule and widely used in different industrial areas, with emphasis on the petroleum, biomedical and detergent industries. Recently, interest in environmentally friendly surfactants that are resistant to extreme conditions has been increased because of consumers' appeal for sustainable products and industrial processes that often require these characteristics. With this context, the need arises to search for surfactants produced by microorganisms coming from extreme environments and to mine their unique biotechnological potential. The production of biosurfactant is still incipient and presents challenges regarding economic viability, due to the high cost of the cultivation, production, recovery and purification. Advances can be made by exploring the extremebiosphere and bioinformatics tools. This review focuses on biosurfactants

produced by microorganisms from different extreme environments, presenting a complete overview of what information is available in the literature, advances, challenges and future perspectives, as well as showing the possible applications of extreme biosurfactants.

Keywords

Extremophiles. Extreme biomolecule. Biosurfactants. Industrial applications.

Introduction

Extremophiles are those microorganisms that require extreme conditions to grow optimally, and some require more than one extreme to develop, called polyextremophiles (Rothschild and Mancinelli 2001). They are found in different environments distributed around the Earth, either with physical extremes such as temperature, radiation and pressure, or chemical extremes such as pH, salinity, desiccation and redox potential (Stan-Latter 2012). As a consequence of the extreme environmental conditions of these sites, the microorganisms that live there have developed biological adaptations, mechanisms and strategies to remain metabolically active (Straub et al. 2017).

Due to this, extremophiles have great biotechnological potential and are the targets of constant research in the search and discovery of new bioproducts due to their unique characteristics that allow them to act in such environmental conditions (Horikoshi and Bull 2011). One of the bioproducts targeted by the industries are the surfactants, which are amphipathic organic molecules with tensioactive and emulsification action (Pacwa-Płociniczak et al. 2011) and considered one of the most versatile compounds within industrial processes.

Surfactants are an important class of industrial chemicals due to their properties, resulting in wide use in different sectors of modern industry (Banat et al. 2010), as in the pharmaceutical, food, cosmetics, toxic waste cleaning industry of industrial and agricultural origin, also in the health area, as antimicrobial agents, immunoregulators and immunomodulators (Basit et al. 2018; Camargo et al. 2018), and also, in the oil industry (remediation, reduction of waste in the pipelines and improved recovery of oil) (Shibulal et al. 2017).

As a result of the extensive use of surfactants, the global surfactant market in 2014 showed a turnover of US\$ 29.93 billion (Grand View Research 2016). The surfactant market is expected to fetch US\$ 44.6 billion by 2020, based on the 2014-2020 forecast period. The major contributors to this scenario are the household detergent, laundry and personal care industries, because 54% of the total surfactant production around the world is destined for these areas (Banat et al. 2010).

Most commercially available surfactants are chemical surfactants, which are derived mainly from petroleum products (Jemil et al. 2016). With rapid advances in biotechnology and increased environmental awareness among consumers, there has been a general desire to find environmentally friendly surfactants that replace chemically synthesized compounds (Perfumo et al. 2018), such as products of biological origin (Banat et al. 2014), providing a new impulse for the use of biological surfactants as an alternative. Biosurfactants, which are surfactants produced by microorganisms, offer several advantages, such as low toxicity, high biodegradability and produced from renewable materials (residues), shows greater surface and interfacial activity in low concentration, and also, by being active and stable under extreme conditions of temperature, pH and salinity (Vijayakumar and Saravanan 2015; Jemil et al. 2016).

Although microorganisms from extreme environments have attractive characteristics for the biotechnological application, as well as the use of biosurfactants as a sustainable alternative to chemical surfactants, these present some disadvantages and challenges to be overcome, such as the complexity of mimicking extreme environments in the laboratory (Adrio and Demain 2014) and the price of the biosurfactant due to the costs incurred for its production, but mainly recovery from the culture medium and purification (Najmi et al. 2018). Even in the face of challenges, researchers and industries continue to explore the extremebiosphere, searching for bioproducts from extreme environments for application in the most diverse biotechnological areas that have extreme conditions. Thus, the scientific community is committed to advancing the challenges of the cultivation of extremophiles, the production and purification of the biosurfactant for marketing purposes.

This review aims to describe the groups of extremophilic microorganisms from different extreme environments and their capacity to produce biosurfactant, and to provide a current overview about the researches in the production, identification and

application of biosurfactants from extremophilic microorganisms. It also aims to discuss, based on recent literature, the challenges, advances and direction in the research and future perspectives in this field, from the search, production and the potential application of biosurfactants in the industry.

Biosurfactants and their source in extreme environments

In recent years, several organisms capable of inhabiting extreme environments considered lethal to man and any other form of life have been discovered, and increasingly the limits of life are overcome (Horikoshi 2011). These organisms are called extremophiles and require extreme conditions for their optimal growth and development (Rothschild and Mancinelli 2001). They are distributed in the three domains of life; however, they mainly include prokaryotic organisms – Bacteria and Archaea, which also exhibit adaptations to some extreme environmental conditions (Stan-Latter 2012).

Seeing as they are present in extreme environments, these organisms undergo selective pressure, in order to handle with the constant environmental challenges presented to them, and develop adaptations for local survival, providing a unique perspective on the fundamental characteristics of biological processes, such as limits biochemical parameters for macromolecular stability and genetic instructions for the construction of macromolecules that stabilize in one or more extreme conditions. These organisms exhibit a broad metabolic diversity and physiological capabilities, unique and versatile (Rampelotto 2013; Straub et al. 2017). Due to these characteristics, extremophiles are considered candidates with high potential to offering sources for (new) bioproducts, such as enzymes, biocides, metabolisms and genes, as well as metabolites, which can cite biosurfactants and emulsifiers.

Biosurfactants are a heterogeneous group of organic molecules produced as metabolic byproducts of microorganisms, being present on the surface of the microbial cell or extracellularly excreted. These are amphipathic molecules and for this reason are considered tensioactive agents, with the capacity to reduce surface and interfacial tension at the interfaces between immiscible liquids, solids and gases, allowing the two distinct phases to mix and interact (Banat et al. 2010). As a result of the interaction between the two phases surfactant's accumulation, have the formation of micelles,

which are the surfactant monomer agglomerates. Micelles allow the surfactant to decrease interfacial and surface tension and, therefore, increase the solubility and bioavailability of hydrophobic organic compounds (Varjani and Upasani 2017).

The properties of surfactants make them one of the most promising and versatile chemical compounds (Banat et al. 2010), since their characteristics confer excellent emulsification, detergency and dispersion properties (Zhong et al. 2016), developing an important role in different fields of application, such as bioremediation, biodegradation, oil recovery – which are linked to the oil industry, pharmaceuticals, food, cosmetics, cleaners and many other biotechnological applications (Almeida et al. 2016).

Biosurfactants are characterized by their varied structures, such as glycolipids, lipopeptides, lipoproteins, fatty acids, neutral lipids, phospholipids, polymeric biosurfactants and particulates (Jemil et al. 2016), which can be divided into two main classes based on their biochemical nature – biosurfactant and bioemulsifiers (Fig. 1). Compounds that have low molecular weight are called biosurfactants, such as lipopeptides (e.g. surfactin and fengycins), glycolipids (e.g. rhamnolipids and sophorolipids) and phospholipids (e.g. phosphatidylethanolamine) (Janek et al. 2013; França et al. 2015), and efficiently reduce surface and interfacial tension. High molecular weight biosurfactants, such as lipoproteins, lipopolysaccharides, proteins, polysaccharides and complexes of biopolymers (e.g. emulsan and alasan) are more effective as emulsion stabilizing agents (Lovaglio et al. 2015).

Compared to the chemically synthesized surfactants, where the great majority are derived from petroleum, biosurfactants offer several advantages in emulsification, dispersion, foam, detergency and wetting, depending the microorganism and conditions used to produce the biomolecule (Gudiña et al. 2015). Additionally, present low toxicity, high biodegradability and high ecological compatibility and present potential of application in environmental protection (Yu et al. 2014), capacity to be synthesized from renewable raw materials, specific activity at extreme temperatures, pH and salinity, and are compounds that reduce the surface tension with a very low critical micelle concentration (Jemil et al. 2016).

Processes linked to industrial, medical and environmental applications often involve exposure to extreme temperatures, pressure, ionic strength, pH and organic solvents, and for this, require microorganisms and metabolites that support these

conditions (Cameotra and Makkar 1998). The search for new biosurfactants in extremophiles appears to be particularly promising, since they have particular adaptations to increase stability in adverse environments and their microbial products are highly stable. Hence, there is a continuing need to isolate microorganisms capable of developing and being active in extreme conditions (Cameotra and Makkar 1998; Sarafin et al. 2014).

Biosurfactants from cold environments

Microorganisms from cold environments, such as glaciers, alpine regions, snow, deep ocean environments, the polar oceans, ice caves and permafrost (Feller 2013), are seen as reservoirs of biotechnological molecules such as enzymes, antibiotics and biosurfactants (Perfumo et al. 2018). Biosurfactants from organisms adapted to cold can interact with multiple physical phases – water, ice, hydrophobic compounds and gases – at low temperatures, free from unsustainable products and low energy impact in bioprocesses, but there is little information available on biosurfactants from cold-adapted microorganisms when compared with mesophiles (Perfumo et al. 2018).

According to Vasileva-Tonkova and Gesheva (2004) and Vollú et al. (2014), the ability of psychrophiles to produce biosurfactants seems to be a common feature, since 50% of the members of microbial communities in polar soils and sediments were positive at the screening. *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus* and *Bacillus* have also been described as biosurfactant producers, which also prevail in cold habitats (Gesheva et al. 2010; Janek et al. 2013).

It has also been described marine bacteria found in polar, deep and polar marine sediments that have been described as biosurfactant producers, belonging to the genera *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Marinomonas*, *Halomonas*, *Rhodococcus* and *Cobetia* (Konishi et al. 2014). In the study developed by Cai et al. (2014), which they screened for biosurfactant-producing bacteria isolated from different marine environments of the Canadian Arctic, the authors observed that species of the genus *Rhodococcus* predominated, followed by *Bacillus*, had the capacity to produce biosurfactant at 4°C, with maximum index of emulsification of 62.5%, which it is considered a good result.

Malavenda et al. (2015) also presented the production of biosurfactants at 4°C by the genera *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas* and *Rhodococcus*, as well as the species *Idiomarina loihiensis*, which were collected from Antarctic and Arctic polar environments. The best results were shown by isolates of *Rhodococcus*, with index of emulsification between of 60% and surface tension to 27.3 mN m⁻¹. Yakimov et al. (1999, 2004) observed that the psychrophilic strains belonging to *Rhodococcus* and *Sphingomonas* isolated from Ross Sea, Antarctica, besides being capable of degrading naphthalene and biphenyl as single sources of carbon, produced biosurfactant at low temperatures.

From Antarctic marine samples, Jadhav et al. (2013) described the ability of the isolate *Oceanobacillus* sp. BRI 10 in produce biosurfactant (glycolipoprotein) under low temperatures (4 and 15°C) and been stable under changes of temperature (15 to 110°C) and pH (2.0-12.0). Additionally, did not exhibit cytotoxicity against Vero cells at very high concentrations up to 4000 µg mL⁻¹ and could be used in pharmaceutical and cosmetic industry.

Perfumo et al. (2018) report that one of the most highly valued biosurfactant-producing microorganisms currently is *Moesziomyces antarcticus* (formerly described as *Candida antarctica*). This microorganism was originally isolated from Lake Vanda in the Wright Valley, Antarctica, and it is a yeast known for the production of industrially relevant molecules, mainly for the cosmetics area, such as mannosylerythritol lipids, a type of glycolipid biosurfactants (Morita et al. 2013). It was observed by Morita and colleagues that this biosurfactant can be produced in high yields (up to 100 g L⁻¹) from the vegetable oils substrate and by intermittent feeding of the bioreactor and could be synthesized under moderate conditions and at temperatures subzero, showing antiagglomeration activity. This achieve a high ice-packing factor and makes them very attractive for industrial application, such as ice–water systems (ice storage, industrial process cooling, refrigeration, and air conditioning) (Kitamoto et al. 2001).

Another genus of yeast widely distributed in polar and glacial environments is *Rhodotorula*, which contains several species known to be hyperproducers of sophorolipid biosurfactants (carbohydrate-based) (Perfumo et al. 2018). According to the authors, it is necessary to explore the biosynthetic potential of psychrophilic eukaryotes valuable to expand the collection of producing organisms with new extremophilic strains.

Biosurfactants from thermophilic environments

Another extreme environment that is little sought to verify the capacity of biosurfactants production by the microbial community, are the thermophilic environments, including natural environments, such as hot springs, volcanoes and deserts, as well as constructed, such as effluents treatment and composting (Herbold et al. 2014, Lopez-Vazquez et al. 2014). The majority of the works developed aiming the biosurfactants production were carried out under mesophilic conditions (Sharafi et al. 2014) and the few studies that describe the production of biosurfactants from microorganisms from thermophilic environments are those isolated from oil reservoirs (60 to 160°C).

Tabatabaee et al. (2005) worked with deep oil reservoirs from the southern part of Iran, where temperatures ranged from 65 to 110 °C. From the 35 strains isolated and selected to verify the biosurfactant production, 23 had the emulsification index of 70%; of these, 8 showed ability to reduce surface tension below 40 mN m⁻¹ and were characterized as strains belonging to the genus *Bacillus*.

Daryasafar et al. (2016) isolated the bacterium *Bacillus licheniformis* from the Zilaei oil reservoir in the southwest of Iran. The authors found that the strain grew optimally at 50 °C and under this condition, the biosurfactant produced reduced the surface tension from 72 to 23.8 mN m⁻¹ and the tension interface from 36.8 to 0.93 mN m⁻¹. This same species was studied by El-Sheshtawy et al. (2015) and isolated from Niage field, located in Western desert, Egypt. It presented a maximum emulsification index of 96% and showed a reduction to 36 mN m⁻¹ when incubated for 72 hours at 45 °C, which it is considered a good result.

Other thermophilic environments were also explored, such as a Antarctic volcano, where Coronel-León et al. (2015) collected the thermophilic bacterium identified as *Bacillus licheniformis* AL 1.1, which was isolated from uncontaminated Kroner lake soil in Whalers Bay (Deception Island). The authors verified the strain produced biosurfactant that decreases water surface tension to 28.5 mN m⁻¹ and achieves the critical micelle concentration of 15 mg L⁻¹, and presented stability in a wide range of pH (6.0-11.0), under high temperatures (up to 120°C) and variable salt concentrations (concentration of NaCl up to 20 %). Its heat resistance and capacity to emulsify oils indicate a possible application in cosmetics industry.

Zarinviarsagh et al. (2017) isolated bacteria from the hot spring Gheyнарje Nir, located in Ardebil, Iran, and verified if they were biosurfactant producers and if the compound was stable against changes in pH, temperature and salinity. The authors reported that the strain identified as *Ochrobactrum intermedium* strain MZV101 produced biosurfactant and that it was stable in the presence of alkaline condition (pH 10.0-13.0), with the average emulsification index (E24) of 65.58% and showed a decrease when the pH was reduced (pH 5-6) to 31.84% of emulsification. The same strain had high emulsification rates at low temperatures (4 °C, E24 = 66.25%) and at high temperatures (60 °C, E24 = 70.41, 70-90 °C, E24 = 69.34%).

From desert soil and hot springs water, 47 samples of thermophilic bacteria were isolated and 11 of them shows as potent biosurfactants producers, belonging to the genera *Achromobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Lysinibacillus*, *Ochrobactrum* and *Pseudomonas* (Joy et al. 2017). The authors, when conducting a chemical analysis of the bioproduct, showed for the first time the production of glycolipids by *Achromobacter* sp. PS1, and the biosurfactant showed emulsification of 69.9% at 24 h and reduction of surface tension at 30.43 mN m⁻¹. Other significant results were observed with the genera *Ochrobactrum* (GREW1) and *Bacillus* (SB2), where both presented as lipopeptide biosurfactants producers with surface tension values of 31.14 mN m⁻¹ and 28.16 mN m⁻¹ and emulsification of 59.51% and 61.35%, respectively. Also, from hot spring, but from Tuva-Timba, Gujarat, India, under temperatures ranging from 45 to 85 °C, Joshi et al. (2013) observed that 34 bacterial isolates produced biosurfactant under these conditions.

A study by Sharafi et al. (2014) with the thermophilic bacterium *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain MK01, isolated from thermophilic samples of an Iran landfill, was conducted to verify the ability of the isolate to produce biosurfactant and to test its stability at different temperatures and pH. As results, the authors observed that strain MK01 was particularly efficient in biosurfactant production, able to synthesize up to 2 g L⁻¹ biosurfactant after 24 h of culture and its maximum yield of approximately 5 g L⁻¹ was obtained after 120 h of culture, and the biosurfactant reduced the surface tension of water from 72 to about 43 mN m⁻¹, which it is not characterized by being a good result. Additionally, biosurfactant was stable in different temperatures (range 20 to 90°C) and its preliminary characterization indicated that it is a lipopeptide, being the first report of these species.

Biosurfactants from extreme pH environments

The best known biosurfactant producers are neutrophilic bacteria and there are very few data in the literature on the production of emulsifying or surfactant compounds, whose optimal functioning of the microorganism occurs with extreme pH values (Ivanova et al. 2016), and those that report were carried out in the last few years.

Elazzazy et al. (2015) worked with *Virgibacillus salarius* strain KSA-T isolated from soil near to the Red Sea in the Jeddah region, Saudi Arabia. The biosurfactant production tests showed that the strain exhibited maximum biosurfactant production when the pH was increased from 5.0 to 9.0, it was stable in temperature (30 to 100°C), pH (4.0-12.0) and salinity (1-10% of NaCl), and identified with a lipopeptide nature of a biosurfactant. With these results, the authors suggested the potential use in the pharmaceutical, cosmetics and food industries and for bioremediation in marine environment.

Karwowska et al. (2015) studied the biosurfactant production by *Acidithiobacillus thiooxidans* and observed that at pH 2-3, the acidophilic bacteria produced a biosurfactant concentration of 7.0 to 11.0 mg L⁻¹. Another study involving the biosurfactant production by acidophilic bacteria was developed by Arulazhagan et al. (2017), which isolated the species *Stenotrophomonas maltophilia* strain AJH1 from a mining site in Saudi Arabia and observed that the isolate produced a biosurfactant capable of reducing surface tension at 41.1 mN m⁻¹, which it is not an impressive result, and efficiently degraded polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) under acidic conditions (pH 2) at 30 °C.

Ivanova et al. (2016) reported the biodegradation of petroleum hydrocarbons and the production of stable biosurfactant under acidophilic conditions by mycobacteria AGS10 collected at a sulfur storage site for gas processing in Astrakhan, Russia, where the pH was below 3.0. The biosurfactant produced by the acidophilic mycobacteria showed stability in a wide range of pH values (1.0–9.0), with the maximum of activity at pH 1.0–3.0 (31.0–31.6 mN m⁻¹); its activity did not decrease significantly with heating to up to 100°C; and NaCl content ranging from 0 to 6% did not have any significant effect on the biosurfactant activity. Due to these properties, the authors cite that the AGS10 culture should be considered as a promising subject

for further research into the mechanisms underlying assimilation of hydrophobic substrates, because it was the first known acidophilic hydrocarbon-oxidizing surfactant producer.

Biosurfactants from saline and hypersaline environments

The search of biosurfactant producers in saline and hypersaline environments has been increasing in the recent years (Khemili-Talbi et al. 2015). Nercessian et al. (2015) carried out an exploration of halophilic microorganisms producing biosurfactant, among other bioproducts, isolated from two salterns from Argentina. It was verified that the Archaea *Haloarcula argentinensis*, *Haloarcula japonica*, *Haloarcula vallismortis*, *Halorubrum tebenquichense*, *Halobacterium salinarum*, *Halobacterium* sp., *Halobacterium piscisalsi* and the Bacteria *Salinibacter ruber* and *Salicola* sp. were present on these locations and were submitted to the biosurfactant production test on two substrates, olive oil and xylenes. The results showed that all strains, except *Halobacterium* sp., emulsified in olive oil and xylene, and were more active than the positive controls SDS (1%) and Triton X-100 (1%) in olive oil. The emulsions were stable for up to 45 days, and when submitted to high salt concentrations, they obtained results superior to the positive controls.

According to Kebbouche-Gana et al. (2009), among the five isolates of halobacteria isolated from salterns in Ain Salah, Algeria, the genera *Halovivax* and *Haloarcula* showed to produce peptidoglycolipid biosurfactants, reducing the surface tension of the medium below 29 mN m⁻¹ and with high emulsion stabilization capacity even at high salt concentration – up to 35% NaCl, being the first time the biosurfactant production at such a high concentration has been reported. In this same saltern, Kebbouche-Gana et al. (2013) studied the biosurfactant production by the species *Natrialba* sp. strain E21, which is considered extremely halophilic. The results show that *Natrialba* sp. was able to produce biosurfactant and that it maintained its emulsification of 50% in 24h and reduced the surface tension of the medium to 27 mN m⁻¹.

The strain *Natrialba* sp. C21, halophilic archaea, was also isolated from the Salin Ain Salah (Algeria) and studied by Khemili-Talbi et al. (2015), in order to verify its ability to grow on substrate containing aromatic hydrocarbons and at a saline

concentration of 25% NaCl, and to produce biosurfactant under these conditions. The strain was able to develop under these extreme conditions and produced biosurfactant with an emulsification index ranging from 81.9 (pyrene) to 86.9% (olive oil), and a reduction in surface tension was observed up to 28.3 mN m⁻¹, 33.2 mN m⁻¹ and 34.8 mN m⁻¹ when the strain was grown in phenol, naphthalene and pyrene, respectively. In addition, the biosurfactant presented stability at alkaline pH (8-12) and in different temperatures (30-100°C).

Couto et al. (2015) carried out the search for the production of biosurfactants by spore-forming bacteria from marine and hypersaline environments of an environmental protection area located in Rio de Janeiro, Brazil. The authors verified that *Bacillus* spp. predominated in all samples from saline and hypersaline environment and reported for the first time the biosurfactant production by *Bacillus asahii*, *B. detrensis*, *Fictibacillus barbaricus*, *Paenisporosarcina indica*. When studying species of the genus *Bacillus*, Yakimov et al. (1997) reported the production of biosurfactant by the BAS 50 strain of *Bacillus licheniformis*, in which it was able to grow and produce a lipopeptide surfactant when grown on a variety of substrates at salinities with a concentration of up to 13% NaCl.

Another study developed in halophilic environments of Brazil was realized by Silva et al. (2015) in the Trindade Island, located in the state of Espírito Santo, where they identified and isolated biosurfactant producers such as *Bacillus subtilis* and showed stability and reduction of surface and interfacial tension in different salt concentrations (up to 175 g L⁻¹), where the best result of reduction of water surface was found in concentration of 100 and 150 g L⁻¹. According to the authors, one of the potential applications is for in situ MEOR.

The *Kokuria marina* BS-15, a halophilic strain, isolated from Indian solar salt work, presented biosurfactant production under hypersaline conditions, and the authors identified two lipid compounds with surfactant properties, Cyclopropane and Nonanoic acid (Sarafin et al., 2014). Donio et al. (2013) worked with the same solar salt and isolated three different halophilic and biosurfactant-producing strains – *Halomonas* sp. BS4, *Bacillus* sp. and *Bacillus subtilis*, with emphasis on the BS4 strain, which presented the best results in the biosurfactant screening and also, inhibited the growth of important biomedical pathogenic bacteria and fungi, suggesting the use in the pharmacological industry.

Biotechnological applications of extreme biosurfactants

Recently, biosurfactants have gained prominence and being recognized as the multifunctional materials of the 21st century, contributing significantly to the development of biotechnology in recent years (Marchant and Banat 2012). This is mainly due to the numerous potential industrial applications, highlighting the petroleum, cosmetic, detergent, food, nanotechnology and agriculture industries, as well as medical, pharmaceutical and environmental industries in the areas of bioremediation and waste and effluent treatment. Often these industries have processes that involve the exposure of extreme conditions, such as temperature, pressure, salinity, pH, organic solvents, among others (Cameotra and Makkar 1998).

As a result of this new biotechnology context, researchers are concentrating their efforts on the isolation and selection of strains from extreme environments that are capable of producing biosurfactant under harsh conditions (Fig. 2). The Table 1 summarizes studies of biosurfactant-producing microorganisms that have been isolated from different extreme environments and the potential application suggested by the authors.

Application in oil industry

Based on the studies cited in the previous topic and as showed in the Table 1, it is possible to state that the search for biosurfactants from extreme environments is for application in the petroleum industry. The versatility of the extreme microorganisms and their metabolisms and products with unique characteristics, besides having the intrinsic capacity to mediate the transformation of complex raw materials in a wide range under extreme conditions, make them important sources of biosurfactant for the petroleum industry, mainly for microbial enhanced oil recovery (MEOR) and bioremediation of environments contaminated by petroleum hydrocarbons, but also for cleaning oil sludge in storage tanks and to facilitate a better transport of heavy oil in the pipeline (Assadi e Tabatabaee 2010; Sobrinho et al. 2013).

Due to the ability to reduce surface and interfacial tension, create emulsions and alter hydrophilic or hydrophobic properties of the microbial surface, biosurfactants

strengthen the interaction between pollutants and microorganisms, increase the solubility and availability of the hydrophobic organic compounds, and consequently the removal of these pollutants (Liu et al. 2017). Biosurfactants also help microorganisms to overcome the high toxicity of the compound and increase remediation efficiency (Zhong et al. 2016).

For the bioremediation processes occurring in extreme environments, which have already been widely reported cases of environmental contamination by petroleum hydrocarbons (Jesus et al. 2015), the biosurfactants must to be active under these physicochemical conditions to perform their abilities.

Sharafi et al. (2014) performed the isolation and identification of *Aneurinibacillus thermoaerophilus* from the thermophilic environment of the landfill in India and found that the strain was able to produce biosurfactant under extreme conditions of salinity and temperature. Nitschke and Pastore (2002) observed that *Bacillus licheniformis* JF-2 lipopeptide can be stable at temperatures around 75 °C for up to 140 h. In the study of Banat (1993), the thermotolerant species of the genus *Bacillus*, which was able to grow at temperatures up to 50 °C in medium containing petroleum hydrocarbons, produced biosurfactants under these conditions.

During the exploration in oil fields there is the contamination of sea water by compounds of high aliphatic and aromatic content, such as benzene and toluene, which are difficult to remedy (Das and Chandran 2011). In the study developed by Elazzazy et al. (2015), the authors stated that due to the characteristics of the biosurfactant produced by the thermophilic strain *Virgibacillus salarius* in vegetable oil to maintain its activity of wide temperature range (30-100°C) and hypersalinity (10% NaCl), the biosurfactant could be used in different biotechnological aspects, including bioremediation in marine environments. The same conclusion was obtained by Gomes et al. (2018) when they observed the degradation of petroleum hydrocarbons, such as hexadecane, phenol, naphthalene, phenanthrene, pyrene and benzopyrene, as the sole carbon source, in a high salinity environment (9% NaCl) and the production of biosurfactant under these conditions by the *Modicisalibacter* sp. MOD 31.J, *Brevibacterium* sp. MOD 23.9 and *Idiomarina* sp. R2A 23.10.

Silva et al. (2015), also aiming at bioremediation in saline environments, obtained bacterial isolates capable of producing surfactants and remain stable and active in salt concentrations up to 175 g L⁻¹, while Couto et al. (2015) found spore-

forming bacteria capable of degrading kerosene and hexadecane and producing biosurfactant under hypersaline condition (20% NaCl). Knowledge about halophilic microorganisms capable of degrading petroleum hydrocarbons and producing biosurfactant will help to design better bioremediation strategies in hypersaline environments (Fathepure 2014).

It has also been found bacteria that perform bioremediation of environments impacted by petroleum hydrocarbons under acidic conditions (Sharma et al. 2016), such as the acidophilic bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*, which degraded polycyclic aromatic hydrocarbons and produced biosurfactants at pH 2 (Arulazhagan et al. 2017). It has also been reported by Christen et al. (2012) the biodegradation of phenol by the acidophilic and hyperthermophilic archaea *Sulfolobus solfataricus* 98/2.

In order for biosurfactants or microorganisms producing biosurfactants to assist in the different strategies of oil recovery, they must be able to be active under the severe environmental conditions of the oil reservoir, which present high temperature, pressure, salinity and low levels of oxygen (Cameotra e Makkar 1998). From this perspective, several works are reported in the literature of extremophiles with potential to be used in MEOR.

According to the study developed by Dhanarajan et al. (2017), the lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus megaterium* could be used in conjunction with a biopolymer produced by thermophilic *Bacillus licheniformis* for application in improved oil recovery. The biosurfactant obtained after the acid precipitation reduced the surface tension of 70.5 to 28.25 mN m⁻¹ and the interfacial tension between lubricating oil and water of 18.6 to 1.5 mN m⁻¹ at a concentration of 250 mg L⁻¹. Additionally, the biosurfactant presented a lubricating oil emulsification activity of 81.66% and, added to the biopolymer in a concentration of 3 g L⁻¹, 45% recovery of the oil, characterizing a suitable alternative to traditional recovery.

The thermophilic strain *Bacillus atrophaeus* 5-2a was studied by Zhang et al. (2016) aiming at the production of biosurfactant and its application in MEOR and observed that the strain produced a potent biosurfactant with high surface activity and emulsification property, reducing the surface tension to 26.52 mN m⁻¹, and exhibited appreciable emulsification activity against paraffin oil (E24 = 59.49%). In addition, the bioproduct remained stable under severe pH, temperature and salinity conditions, and

recovered more than 90% crude oil in the experiment on contaminated filter paper and sand.

Application in pharmaceutical industry

It has been demonstrated in some studies (Gudiña et al. 2016; Balan et al. 2017), that biosurfactants have therapeutic applications such as antibiotics, antifungals, antivirals and even antitumor activities, and that make them potential alternatives to conventional therapeutic agents. The compounds generally exhibit anti-adhesive and anti-biofilm activities, rendering them useful to reduce adhesion and colonization by pathogenic microorganisms, as well as to remove preformed biofilms. The medical and pharmaceutical interest in surfactants from microorganisms has increased in recent years, as they are selective and good in extreme conditions (Desai and Banat 1997; Cortes-Sanchez et al. 2013).

The studies of Llamas et al. (2012), Donio et al. (2013), Sarafin et al. (2014) and Nercessian et al. (2015) showed the application of biosurfactants produced by halophilic microorganisms, such as members of the genus *Halomonas* and *Haloarcula* in the pharmaceutical and biomedicine industry. In particular, Donio et al. (2013) conducted a study to verify the production of biosurfactant by the strain *Halomonas* sp. BS4, isolated from a solar salt work in India, and observed the antibacterial activity of the biosurfactant against some human pathogens, such as *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Streptococcus pyrogenes* and *Salmonella typhi*, the latter being the most inhibited. The authors also tested against some species of fungi and found that there was a high antifungal activity against *Aspergillus niger* and *Fusarium* sp. Thus, they concluded by stating that the next step would be the purification of surfactant compounds and the application in the pharmaceutical industry for the manufacture of new drugs.

Application in detergents industry

The biosurfactants can also be used in the detergent industry, which is considered one of the largest consumers of biosurfactant (Banat et al. 2010). The detergent field requires biosurfactant with characteristics of stability at alkaline pH and

thermophilic temperatures, because of the washing process and performance (Grbavčić et al. 2011).

Aiming this application, Zarinviarsagh et al. (2017) observed that *Ochrobactrum intermedium* strain MZV101, isolated from Gheynarje Nir hot springs Ardebil, in Iran, produced biosurfactant with an index of emulsification of 62.2% at 60°C and pH 10.0, and positive result for drop collapse assay and oil spreading assay. Also, the biosurfactant remained stable under alkaline conditions of pH (5.0-13.0), presenting the best results at pH 10.0 to 13.0 and high temperatures of 60 to 90°C.

In recent years, the detergent industry have assessing the environmental impact of their products and new directions have been established, such as the development of formulations of washing products containing biosurfactants for an effective detergency at lower temperatures, that will help laundry practices to save energy and reduce the environmental impact (Perfumo et al. 2018). Low-temperature microbiology has recently come into the scientific spotlight for this biotechnological application.

Challenges and future directions

The production of biosurfactants from extremophiles presents challenges that must be overcome to make production and commercialization feasible on a commercial scale for application in the different biotechnological aspects. Some limitations are the same of mesophilic microorganisms and widely discussed, such as, costs of biosurfactant production, productivity in large-scale, foaming production and product lost in the recovery and purification processes and final price of the product (Winterburn and Martin 2012; Banat et al. 2014).

Specifically, for the production of biosurfactant by extremophiles, it should be borne in mind that although microorganisms from extreme environments have attractive characteristics for biotechnological applications, it is difficult to find microbial strains that produce high yields when grown industrial applications. Part of this is due to the difficulty of mimicking extreme conditions in the laboratory and allowing these microorganisms to synthesize the target bioproducts (Adrio and Demain 2014). This attempt requires a large investment of funds, energy, development and adaptation of the necessary cropping methods, which makes the process more expensive and not marketed widely due to excessive cost (Coker 2016; Krüger et al. 2018).

Currently, in order to overcome the challenges of extremophiles cultivation and to verify the capacity of biosurfactant production by cultivated and non-cultivated species from extreme environments (Fig. 3), we have sought the assistance of omic tools, such as metagenomic and metatranscriptomic analysis (Perfumo et al. 2018), that has allowed us to make huge leaps in understanding the remarkable complexity and versatility of extremophiles (Cowan et al. 2015). These technologies allow rapid identification of the genetic potentials, new metabolites that can also be used for the generation of new synthetic products and knowledge of metabolic pathways with optimal performance, without the necessity to cultivate the microorganism (Khan and Kihara 2014).

For the mining of (new) biosurfactants in metagenomes, the total DNA is directly extracted from the environmental sample and sequenced, offering the opportunity to explore all the operons and coding-genes for biosurfactant biosynthesis presented in the sample (Sachdev and Cameotra 2013). According to the authors, the gene related to biosynthesis of bacterial surfactants lie on gene cluster of approximately 3,000–7,000 bp. With the technological advances and the evolution of tools for data processing and analysis, it is possible to analyze a substantial number of genes encoding bioproducts that are of interest for basic and applied research and bioinformatics tools, such as anti-SMASH, aid in the gene mining involved in the synthesis of biosurfactants in these metagenomes (Aleti et al. 2015).

Research can also be carried out based on the similarity of the metagenomic sequences against a gene or protein database, requiring a complete and cured database of information relevant to biomolecule producers, such as biosurfactants. With this demand, Oliveira et al. (2015) developed BioSurfDB, a database designed to allow the modeling of key concepts and relations in the areas of biosurfactant production as well as biodegradation, providing data on 3736 genes, 3430 proteins, 1077 organisms, 58 pathways and a list of 96 cured biosurfactants, grouped by producing microorganisms, name and class of the surfactant.

The existence of cured databases for producers of biosurfactants and tools for analysis is an answer to the necessity for functional analysis of the microbial community and the screening of biosurfactant producers isolated from extreme environments, as it will aid in the development of pipelines for the mass analysis of metagenomes and will allow specificity in the search for this biomolecule.

Recently, it has been possible to recover genomes from metagenomes (MAG) by binning metagenomic contigs according to their coverage and tetranucleotide frequency, followed by an estimation of the bin quality (Ramos-Barbero et al. 2019), and bioinformatic tools allows linking specific microbes to their metabolic capacities (Sangwan et al. 2016). The first reconstructed MAG was *Leptospirillum* GII and *Ferroplasma* t.II from an acidophilic biofilm from acid mine drainage (Tyson et al. 2004).

In the same way for the metagenomic analysis, the mining of the genetic capacities for the production of biosurfactant can be used in the MAGs. Currently our group is using different pipelines to perform the recovery of microbial genomes from thermophilic environments (volcanoes and hot springs) distributed on the planet and making the functional analysis of the recovered genomes using a database of genes and pathways involved in the production process of biosurfactants, specially created for this purpose to screen for the presence of biosurfactant producers. In the future, this tool may allow screening for biosurfactant producers in other extreme environments and will assist in strengthening understanding of the metabolic pathways, genes and potentials of biotechnological application (manuscript in preparation).

There is also metagenomic library screening that provides access to new bioactive molecules, such as biosurfactants, but requires the combination of adequate host organism with a functional expression system and an effective screening pathway (Gabor et al. 2007). According to Sachdev and Cameotra (2013), this functional metagenomic approach seems a promising technique for the biosurfactant mining. The first study with this approach was developed by Thies et al. (2016), using *Escherichia coli* DH10b as host for the expression of metagenomic genes encoding biosurfactants, which was subsequently submitted to high-throughput screening for biosurfactant, producing clones to identify N-acyltyrosine. It was not noticed the use of this method with metagenomes from extreme environments, being an opportunity to be explored.

When the cultivation of extremophiles is possible at the laboratory using culture medium that mimic the conditions of the extreme environment, complete sequencing of the isolates' genome can be performed, and by mining techniques described above, the search for genes involved in the biosurfactant production, visualizing the pathways and metabolisms related. Advances in biosurfactant knowledge at the genome level will also significantly improve our ability to interpret metagenomic data, since functional

metagenomics may lead to the discovery of unknown biosurfactants and is especially suitable for extreme habitats (Cowan et al. 2014; Jackson et al. 2015).

Another alternative is to use genetic engineering tools, modifying microorganisms of industrial importance to acquire or improve new capacities, for example to increase the secretion of biosurfactants and reduce costs, as it is performed with mesophiles (Assadi and Tabatabaee 2010; Bachmann et al. 2014). This option is widely used for mesophiles in order to produce enzymes and could be used for extremophiles to improve the production of biosurfactant.

The use of multi-omics for the search of (new) biosurfactants is still very recent, and still incipient for the search in extreme environments or in microorganisms presented in these environments, needing extensive future work to accelerate the knowledge regarding genes involved in the production of biosurfactant from extremophiles, create specific pipelines to recovery information, and the development of strategies to analyze and explore data from the extreme biosurfactants.

Conclusions

Extreme environments and extremophiles are characterized by being a great source of novel biomolecules with unique properties, but they have so far attracted little attention for the biosurfactant field. There is a growing interest of the industries for ecological, biodegradable surfactants, low toxicity and active and stable biosurfactant in extreme conditions, which are often imposed during industrial processes. Hence, it is necessary to access underexploited areas with high biotechnology importance, such as the search for biosurfactants of microorganisms living in extreme environments and their potential use in the most diverse industrial applications.

Based on the results found on this manuscript, many studies were developed focused on the selection of microorganisms producing biosurfactant, preliminary identification of the chemical composition of the bioproduct and the suggestion of application by the authors. Product yields, purification, complete biosurfactant identification, production optimization and industrial scale-up have rarely been reported or are not performed. Also, there were studies in which the organism was not strictly identified, or the chemical methods used were not suitable for screening or biosurfactant classification.

Aspects of extreme biosurfactants related to experimental and large-scale approaches need to be handled with greater effort to advance further with their biotechnological applications. The use of renewable and low-cost substrates, optimization of biosurfactant productivity, improved and cheaper bioprocesses for bioproduction, recovery and purification, added to genetic engineering techniques and bioinformatics tools, are some strategies that should be further developed to the advancement of this emerging technology.

Despite the notorious advances, we can conclude that the current information is still preliminary and fragmented in relation to the biosurfactants from extreme environments and extremophiles, and the discovery of new types of biosurfactants from organisms of extreme environments and efficient production technology will increase the biotechnological potential and contribute to the dissemination of sustainable practices.

Acknowledgments

The authors would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the National Council for the Improvement of Higher Education (CAPES) and the Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of Rio de Janeiro State (FAPERJ) for the financial support.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Adrio JL, Demain AL (2014) Microbial enzymes: Tools for biotechnological processes. *Biomolecules* 4:117–139.
- Aleti G, Sessitsch A, Brader G (2015) Genome mining: prediction of lipopeptides and polyketides from *Bacillus* and related Firmicutes. *Comput Struct Biotechnol J* 13:192–203.
- Almeida DG, Soares Da Silva RCF, Luna JM (2016) Biosurfactants: Promising Molecules for Petroleum Biotechnology Advances. *Frontiers in Microbiology* 7:1–14.

- Arulazhagan P, Al-Shekri K, Huda Q, Godon JJ, Basahi JM, Jeyakumar D (2017) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by an acidophilic *Stenotrophomonas maltophilia* strain AJH1 isolated from a mineral mining site in Saudi Arabia. *Extremophiles* 21:163–174.
- Assadi M, Tabatabaee M.S (2010) Biosurfactants and their use in upgrading petroleum vacuum distillation residue: a review. *Int J Environ Res* 4:549–572.
- Bachmann RT, Johnson AC, Edyvean RGJ (2014) Biotechnology in the petroleum industry: an overview. *Int Biodeter Biodegr* 86:225–237.
- Balan SS, Kumar CG, Jayalakshmi S (2017) Aneurinifactin, a new lipopeptide biosurfactant produced by a marine *Aneurinibacillus aneurinilyticus* SBP-11 isolated from Gulf of Mannar: Purification, characterization and its biological evaluation. *Microbiol Res* 194:1–9.
- Banat IM (1993) The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters* 15:591–594.
- Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Marchant R (2010) Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87:427–444.
- Banat IM, Satpute SK, Cameotra SS, Patil R, Nyayanit NV (2014) Cost effective technologies and renew-able substrates for biosurfactants production. *Front Microbiol* 5:1–18
- Basit M, Rasool MH, Naqvi SAR, Waseem M, Aslam B (2018) Biosurfactants production potential of native strains of *Bacillus cereus* and their antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities. *Pak J Pharm Sci* 31:251–256.
- Cai Q, Zhang B, Chen B, Zhu Z, Lin, W, Cao T (2014) Screening of biosurfactant producers from petroleum hydrocarbon contaminated source. *Marine Pollution Bulletin* 86:402–410.
- Camargo FP, Prado PF, Tonello PS, Santos ACA, Duarte ICS (2018) Bioleaching of toxic metals from sewage sludge by co-inoculation of *Acidithiobacillus* and the biosurfactant-producing yeast *Meyerozyma guilliermondii*. *Journal of Environmental Management* 211:28–35.
- Cameotra SS, Makkar RS (1998) Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl. Microbiol Biotechnol* 50:520–529.
- Chen XH, Koumoutsis A, Scholz R, Borriss R (2009) More than Anticipated – Production of Antibiotics and Other Secondary Metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 16:14–24.
- Christen P, Vega A, Casalot L, Simon G, Auria R (2012) Kinetics of aerobic phenol biodegradation by the acidophilic and hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* 98/2. *Biochem Eng J* 62:56–61.
- Coker JA (2016) *Extremophiles and biotechnology: Current uses and prospects*. F1000 Research 5.
- Coronel-León J, de Grau G, Grau-Campistany A, Farfan M, Rabanal F, Manresa A, Marqués AM (2015) Biosurfactant production by AL 1.1, a *Bacillus licheniformis* strain isolated from Antarctica: production, chemical characterization and properties. *Annals of Microbiology* 65:2065–2078.

- Cortes-Sanchez AJ, Hernandez-Sanchez H, Jaramillo-Flores ME (2013) Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: new trends and possible therapeutic alternatives. *Microbiol Res* 168:22–32.
- Couto CRA, Alvarez VM, Marques JM, Jurelevicius DA, Seldin L (2015) Exploiting the aerobic endospore-forming bacterial diversity in saline and hypersaline environments for biosurfactant production. *BMC Microbiology* 15:240.
- Cowan DA, Makhalanyane TP, Dennis PG, Hopkins DW (2014) Microbial ecology and biogeochemistry of continental Antarctic soils. *Frontiers in Microbiology* 5:154.
- Cowan DA, Ramond JB, Makhalanyane TP, De Maayer P (2015) Metagenomics of extreme environments. *Curr Opin Microbiol* 25:97–102.
- Daryasafar A, Jamialahmadi M, Moghaddam MB, Moslemi B (2016) Using biosurfactant producing bacteria isolated from an Iranian oil field for application in microbial enhanced oil recovery. *Pet Sci Technol* 34:739–46.
- Das N, Chandran P (2011) Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol Res Int* 2011:1–13.
- Desai JD, Banat IM (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61:47–64.
- Dhanarajan G, Rangarajan V, Bandi C, Dixit A, Das S, Ale K, Sen R (2017) Biosurfactant-biopolymer driven microbial enhanced oil recovery (MEOR) and its optimization by an ANN-GA hybrid technique. *Journal of Biotechnology* 256:46–56.
- Djeridi I, Militon C, GrossiV CP (2013) Evidence for surfactant production by the haloarchaeon *Haloferax* sp. MSNC14 in hydrocarbon-containing media. *Extremophiles* 17:669–675.
- Donio MBS, Ronica FA, Thanga Viji V, Velmurugan S, Adlin Jenifer J, Michaelbabu M, Dhar P, Citarasu T (2013) *Halomonas* sp. BS4, a biosurfactant producing halophilic bacterium isolated from solar salt works in India and their biomedical importance. *Springer Plus* 2:149.
- Elazzazy AM, Abdelmoneim TS, Almaghrabi AO (2015) Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by alkali-halophilic bacteria from Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* 22:466–475.
- El-Sheshtawy HS, Aiad I, Osman ME, Abo-ELnasr AA, Kobisy AS (2015) Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulphate reducing bacteria. *Egypt J Pet* 24:155–162.
- Fathepure BZ (2014) Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *Frontiers in Microbiology* 5:173.
- Feller G (2013) Psychrophilic enzymes: From folding to function and biotechnology. *Scientifica* 512840.
- França IWL, Lima AP, Lemos JAM, Lemos CGF, Melo VMM, De Santana HB (2015) Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. *Catal Today* 255:10–15.
- Gabor E, Liebeton K, Niehaus F, Eck J, Lorenz P (2007) Updating the metagenomics toolbox. *Biotechnol J* 2:201–206.

Gesheva V, Stackebrandt E, Vasileva-Tonkova E (2010) Biosurfactant production by halotolerant *Rhodococcus fascians* from Casey Station, Wilkes Land, Antarctica. *Curr Microbiol* 61:112–117.

Gomes MB, Gonzales-Limache EE, Sousa STP, Dellagnezze BM, Sartoratto A, Silva LCF, Gieg LM, Valoni E, Souza RS, Torres APR, Sousa MP, De Paula SO, Silva CC, Oliveira VM (2018) Exploring the potential of halophilic bacteria from oil terminal environments for biosurfactant production and hydrocarbon degradation under high-salinity conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* 126:231–242.

Grand View Research (2016) Biosurfactants Market by Product (Rhamnolipids, Sphorolipids, MES, APG, Sorbitan Esters, Sucrose Esters) Expected to Reach USD 2308.8 Million by 2020. Available online at: <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/biosurfactants-industry> (Accessed March 5, 2018).

Grbavčić D, Bezbradica L, Izrael-Živković et al. (2011) Production of lipase and protease from an indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strain and their evaluation as detergent additives: compatibility study with detergent ingredients and washing performance. *Bioresource Technology* 102:11226–11233.

Gudiña EJ, Fernandes EC, Rodrigues AI, Teixeira JA, Rodrigues LR (2015) Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. *Frontiers in Microbiology* 6:59.

Gudiña EJ, Teixeira JA Rodrigues LR (2016) Biosurfactants produced by marine microorganisms with therapeutic applications. *Marine Drugs* 14:38.

Herbold CW, McDonald IR, Cary C (2014) Microbial ecology of geothermal habitats in Antarctica. In: Cowan DA (ed) *Antarctic Terrestrial Microbiology: Physical and Biological Properties of Antarctic Soils*. Springer, New York, pp 181–215.

Horikoshi K (2011) Enzymes isolated from alkaliphiles. In: Horikoshi K, Antranikaian G, Bull AT, Robb FT, Stetter, KO (eds) *Extremophiles Handbook*. Springer, Tokyo, pp 164–177.

Horikoshi K, Bull AT (2011) Prologue: Definition, categories, distribution, origin and evolution, pioneering studies, and emerging fields of extremophiles. In: Horikoshi K, Antranikaian G, Bull AT, Robb FT, Stetter, KO (eds) *Extremophiles Handbook*. Springer Tokyo, pp 4–15.

Ivanova AE, Sokolovaa DS, Yu A (2016) Hydrocarbon biodegradation and surfactant production by acidophilic mycobacteria. *Microbiology* 85:317–324.

Jackson SA, Borchert E, O'Gara F, Dobson AD (2015) Metagenomics for the discovery of novel biosurfactants of environmental interest from marine eco-systems. *Curr. Opin. Biotechnol* 33:176–182.

Jadhav VV, Yadav A, Shouche YS, Aphale S, Moghe A, Pillai S, Arora A, Bhadekar, RB (2013) Studies on biosurfactant from *Oceanobacillus* sp. BRI 10 isolated from Antarctic sea water. *Desalination* 318:64–71

Janek T, Łukaszewicz M, Rezanka T, Krasowska A (2010) Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. *Bioresour Technol* 101:6118–6123.

Janek T, Lukaszewicz M, Krasowska A (2013) Identification and characterization of bio-surfactants produced by the Arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. *Colloids Surf B Biointerfaces* 110:379–386.

Jemil N, Ayed HB, Hmidet N, Nasri M (2016) Characterization and properties of biosurfactants produced by a newly isolated strain *Bacillus methylotrophicus* DCS1 and their applications in enhancing solubility of hydrocarbon. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32: 175.

Jesus HE, Peixoto RS, Cury JC, Van Elsas JD, Rosado AS (2015) Evaluation of soil bioremediation techniques in an aged diesel spill at the Antarctic Peninsula. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:10815–10827.

Joshi J, Geetha SJ, Yadav S, Desai AJ (2013) Optimization of bench-scale production of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* R2. *APCBEE Procedia* 5:232–236.

Joy S, Rahman PKS, Sharma S (2017) Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon

degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. *Chemical Engineering Journal* 317:232–241.

Karwowska WA, Wojtkowska M, Andrzejewska D (2015) The influence of metal speciation in combustion waste on the efficiency of Cu, Pb, Zn, Cd, Ni and Cr bioleaching in a mixed culture of sulfur-oxidizing and biosurfactant-producing bacteria. *Journal of Hazardous Materials* 299:35–41.

Kebbouche-Gana S, Gana ML, Khemili S, Fazouane-Naimi F, Bouanane NA, Penninckx M, Hacene H (2009) Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactant. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:727–738.

Kebbouche-Gana S, Gana ML, Ferrioune I, Khemili S, Lenchi N, Akmouci-Toumi S, Bouanane-Darenfed NA, Djelali ND (2013) Production of biosurfactant on crude date syrup under saline conditions by entrapped cells of *Natrialba* sp. strain E21, an extremely halophilic bacterium isolated from a solar saltern (Ain Salah, Algeria). *Extremophiles* 17:981–993.

Khan I, Kihara D (2014) Computational characterization of moonlighting proteins. *Biochem Soc Trans* 42:1780–1785.

Khemili-Talbi S, Kebbouche-Gana S, Akmoussi-Toumi S (2015) Isolation of an extremely halophilic archaeon *Natrialba* sp. C21 able to degrade aromatic compounds and to produce stable biosurfactant at high salinity. *Extremophiles* 19:1109.

Kitamoto D, Ikegami T, Suzuki GT, Sasaki A, Takeyama Y, Idemoto Y, Koura N, Yanagishita H (2001) Microbial conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma* (*Candida antarctica*). *Biotechnol Lett* 23:1709–1714.

Konishi M, Nishi S, Fukuoka T, Kitamoto D, Watsuji TO, Nagano Y, Yabuki A, Nakagawa S, Hatada Y, Horiuchi J (2014) Deep-sea *Rhodococcus* sp. BS-15, lacking the phytopathogenic *fas* genes, produces a novel gluco-triose lipid biosurfactant. *Mar Biotechnol* 6:484–493.

Krüger A, Scäfers C, Schöder C, Antranikian G (2018) Towards a sustainable biobased industry – Highlighting the impact of extremophiles. *New Biotechnology* 40:144–153.

- Lang S, Philp JC (1998) Surface-active lipids in rhodococci. *Antonie Van Leeuwenhoek* 74:59-70.
- Liu G, Zhong H, Jiang Y (2017) Effect of low concentration rhamnolipid biosurfactant on *Pseudomonas aeruginosa* transport in natural porous media. *Water resources research* 53:361–375.
- Llamas I, Amjres H, Mata JA, Quesada E, Béjar V (2012) The potencial biotechnological applications of the exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas almeriensis*. *Molecules* 17:7103–7120.
- Lopez-Vazquez CM, Kubare M, Saroj DP, Chikamba C, Schwarz J, Daims H, Brdjanovic D (2014) Thermophilic biological nitrogen removal in industrial wastewater treatment. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:945–956.
- Lovaglio RB, Silva VL, Ferreira H, Hausmann R, Contiero J (2015) Rhamnolipids know-how: Looking for strategies for its industrial dissemination. *Biotechnol Adv* 33:1715–1726.
- Malavenda R, Rizzo C, Michaud L, Gerce B, Bruni V, Syltatk C, Hausmann R, Giudice AL (2015) Biosurfactant production by Arctic and Antarctic bacteria growing on hydrocarbons. *Polar Biol* 38:1565–1574.
- Marchant R, Banat IM (2012) Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends Biotechnol* 11:558–565.
- Mongkolthanasarak W (2012) Classification of Bacillus Beneficial Substances Related to Plants, Humans and Animals. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 22:1597–1604.
- Morita T, Fukuoka T, Imura T, Kitamoto D (2013) Production of mannosylerythritol lipids and their application in cosmetics. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:4691–4700.
- Najmi Z, Ebrahimipour G, Franzetti A, Banat IM (2018) In situ downstream strategies for cost-effective bio/surfactant recovery. *Biotechnol Appl Biochem* 3.
- Nercessian D, Di Meglio L, De Castro R, Paggi R (2015) Exploring the multiple biotechnological potential of halophilic microorganisms isolated from two Argentinean salterns. *Extremophiles* 19:1133–43.
- Nitschke M, Pastore GM (2002) Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. *Quim. Nova* 25:772–776.
- Oliveira JS, Araújo W, Sales AIL, Guerra AB, Araújo SCS, Vasconcelos ATR, Agnez-Lima LF, Freitas AT (2015) BioSurfDB: knowledge and algorithms to support biosurfactants and biodegradation studies Database 2015: bav03.
- Pacwa-Płociniczak M, Płaza GA, Piotrowska-Seget Z, Cameotra SS (2011) Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International Journal of Molecular Sciences* 12:633–654.
- Pepi M, Cesàro A, Luit G, Baldi F (2005). An Antarctic psychrotrophic bacterium *Halomonas* sp. ANT-3b, growing on n-hexadecane, produces a new emulsifying glycolipid. *FEMS Microbiology Ecology* 53:157–166.
- Perfumo A, Banat IM, Marchant R (2018) Going green and cold: Biosurfactants from low-temperature environments to biotechnology applications. *Trends in Biotechnology* 36:277–289.

- Plaza GA, Zjawiony I, Banat IM (2006) Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 50:71–77.
- Rampelotto, PH (2013) Extremophiles and extreme environment. *Life: Open Access Journal* 3:482–485.
- Raza ZA, Khan MS, Khalid ZM (2007) Evaluation of distant carbon sources in biosurfactant production by a gamma ray-induced *Pseudomonas putida* mutant. *Process Biochem* 42:686–692.
- Ramos-Barbero MD, Martin-Cuadrado AB, Viver T, Santos F, Martinez-Garcia M, Antón J (2019) Recovering microbial genomes from metagenomes in hypersaline environments: The Good, the Bad and the Ugly. *Syst App Microbiol* 42:30–40.
- Rezanka T, Siristova L, Sigler K (2011) Rhamnolipid-producing thermophilic bacteria of species *Thermus* and *Meiothermus*. *Extremophiles* 15:697–709.
- Rothschild LJ, Mancinelli RL (2001) Life in extreme environments. *Nature* 409:1092–1101.
- Roongsawang N, Thaniyavarn J, Thaniyavarn S, Kameyama T, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M, Kanaya S (2002) Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin, and surfactin. *Extremophiles* 6:499–506.
- Sachdev DP, Cameotra SS (2013) Biosurfactants in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97:1005–1016.
- Sangwan N, Xia F, Gilbert JA (2016) Recovering complete and draft population genomes from metagenome datasets. *Microbiome* 4:8.
- Sarafin Y, Donio MBS, Velmurugan S, Michaelbabu M, Citarasu T (2014) *Kocuria marina* BS-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works in India. *Saudi Journal of Biological Sciences* 21:511–519.
- Shaligram NS, Singhal RS (2010) Surfactin - A Review. *Food Technology and Biotechnology* 48:119–134.
- Sharafi H, Abdoli M, Hajfarajollah H, Samie N, Alidoust L, Abbasi H, Noghabi KA (2014) First report of a lipopeptide biosurfactant from thermophilic bacterium *Aneurinibacillus thermoaerophilus* MK01 newly isolated from municipal landfill site. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 173:1236–1249.
- Sharma A, Parashar D, Satyanarayan T (2016) Acidophilic Microbes: Biology and Applications. In: Rampelotto PH (ed) *Biotechnology of extremophiles: Advances and challenges (Grand Challenges in Biology and Biotechnology)*. Springer, New York, pp 215–242.
- Shibulal B, Al-Bahry SN, Al-Wahaibi YM, Elshafie AE, Al-Bemani AS, Joshi SJ (2017) The potential of indigenous *Paenibacillus ehimensis* BS1 for recovering heavy crude oil by biotransformation to light fractions. *PLoS One* 12:e0171432.
- Silva FS, Pylro VS, Fernandes PL, Barcelos GS, Kalks KH, Schaefer CE, Tótola MR (2015) Unexplored Brazilian oceanic island host high salt tolerant biosurfactant-producing bacterial strains. *Extremophiles* 19:561–72.
- Soberón-Chávez G (2004) Biosynthesis of rhamnolipids. In: Ramos JL, editor. *Pseudomonas*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 173–189.

- Sobrinho HB, Luna JM, Rufino RD, Porto ALF, Sarubbo LA (2013) Biosurfactants: classification properties and environmental applications. In: Govil N (ed) Recent Developments in Biotechnology, Studium Press LLC, Houston, pp 1–29.
- Stan-Latter H (2012) Physico-chemical boundaries of life. In: Stan-Latter H, Fendrihan S (ed) Adaptation of microbial life to environmental extremes. Springer-Verlag, New York, pp 1–14.
- Straub CT, Zeldes BM, Schut, GJ, Adams MWW, Kelly RM (2017) Extremely thermophilic energy metabolisms: Biotechnological prospects. *Curr Opin Biotechnol* 45:104–112.
- Tabatabaee A, Mazaheri-Assadi M, Noohi AA, Sajadian VA (2005) Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs. *Iranian J Environ. Health Science & Engineering* 2:6–12.
- Thies S, Rausch SC, Kovacic F et al. (2016) Metagenomic discovery of novel enzymes and biosurfactants in a slaughterhouse biofilm microbial community. *Scientific Reports*, 6:1–12.
- Tyson GW et al. (2004) Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428:37–43.
- Van Bogaert INA, Zhang J, Soetaert W (2011) Microbial synthesis of sophorolipids. *Process Biochemistry* 46:821–833.
- Varjani SJ, Upasani VN (2017) Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresource Technology* 232:389–397.
- Vasileva-Tonkova E, Gesheva V (2004) Potential for biodegradation of hydrocarbons by microorganisms isolated from Antarctic soils. *Z Naturforsch C* 59:140–145.
- Vijayakumar S, Saravanan V (2015) Biosurfactants-types, sources and applications. *Research Journal of Microbiology* 10:181–192.
- Vollú RE, Jurelevicius D, Ramos LR, Peixoto RS, Rosado AS, Seldin L (2014) Aerobic endospore-forming bacteria isolated from Antarctic soils as producers of bioactive compounds of industrial interest. *Polar Biol* 37:1121–1131.
- Winterburn JB, Martin PJ (2012) Foam mitigation and exploitation in biosurfactant production. *Biotechnology Letters* 34:187–195.
- Yakimov MM, Amro MM, Bock M, Boseker K, Fredrickson HL, Kessel DG, Timmis KN (1997) The potential of *Bacillus licheniformis* strains for in situ enhanced oil recovery. *J Petrol Sci Engineer* 18:147–160.
- Yakimov MM, Abraham WR, Meyer H, Giuliano L, Golyshin PN (1999) Structural characterization of lichenysin A components by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 1438:273–280.
- Yakimov MM, Giuliano L, Denaro R, Crisafi E, Chernikova TN, Abraham WR (2004) *Thalassolituus oleivorans* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:141–148.
- Yu H, Xiao H, Wang D (2014) Effects of soil properties and biosurfactant on the behavior of PAHs in soil-water systems. *Environmental Systems Research* 3:6.

Zarinviarsagh M, Ebrahimipour G, Sadeghi H (2017) Lipase and biosurfactant from *Ochrobactrum intermedium* strain MZV101 isolated by washing powder for detergent application. *Lipids in Health and Disease* 16:177.

Zhang J, Xue Q, Gao H, Lai H, Wang P (2016) Production of lipopeptide biosurfactants by *Bacillus atrophaeus* 5-2a and their potential use in microbial enhanced oil recovery. *Microb Cell Fact* 5:168.

Zhong H, Liu G, Jiang Y, Brusseau ML, Liu Z, Liu Y, Zeng G (2016) Effect of low concentration rhamnolipid on transport of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 in an ideal porous medium with hydrophilic or hydrophobic surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 139:244–248.

FIGURES

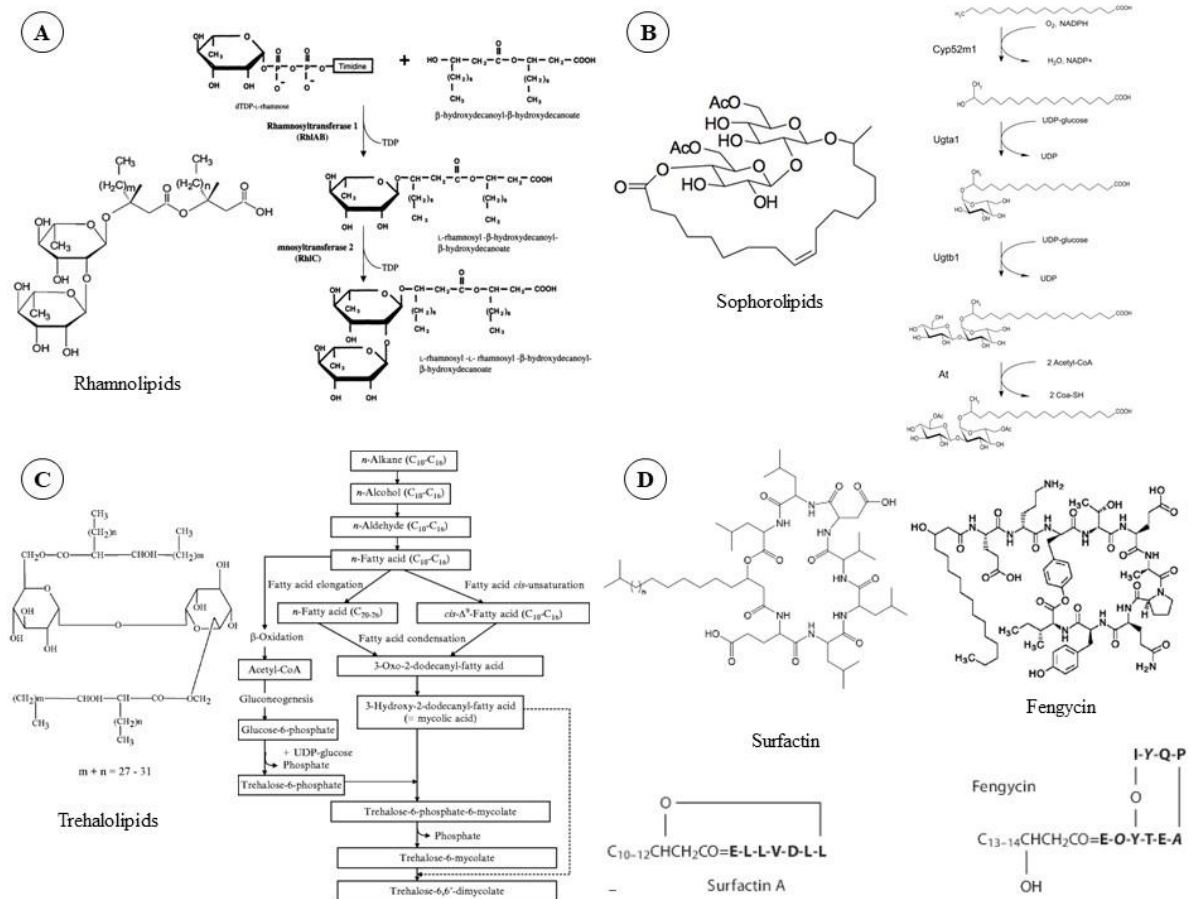


Fig. 1: Structural formulas of the main representatives of biosurfactant types and the respective biosynthesis pathways. **A.** Rhamnolipid structure and biosynthetic pathway (adapted from Soberón-Chávez 2004); **B.** Sophorolipid structure and biosynthetic pathway (adapted from Van Bogaert et al. 2011); **C.** Trehalolipid structure and biosynthetic pathway (adapted from Lang and Philp 1998); **D.** Surfactin and fengycin structure and biosynthetic pathway (adapted from Chen et al. 2009, Shaligram and Singhal 2010 and Mongkolthararuk 2012).



Potential applications of biosurfactants from extreme environments



Fig. 2: Different extreme environments present around the Earth, such as cold environments in Antarctica and Arctic, salt desert of Atacama in Chile and geothermal sites in New Zealand, where extremophiles can be found and to explore biosurfactants producers. Also, the main representative of biosurfactant in this type of environment and the potential uses of biosurfactants from these extremes. Source: Authors.

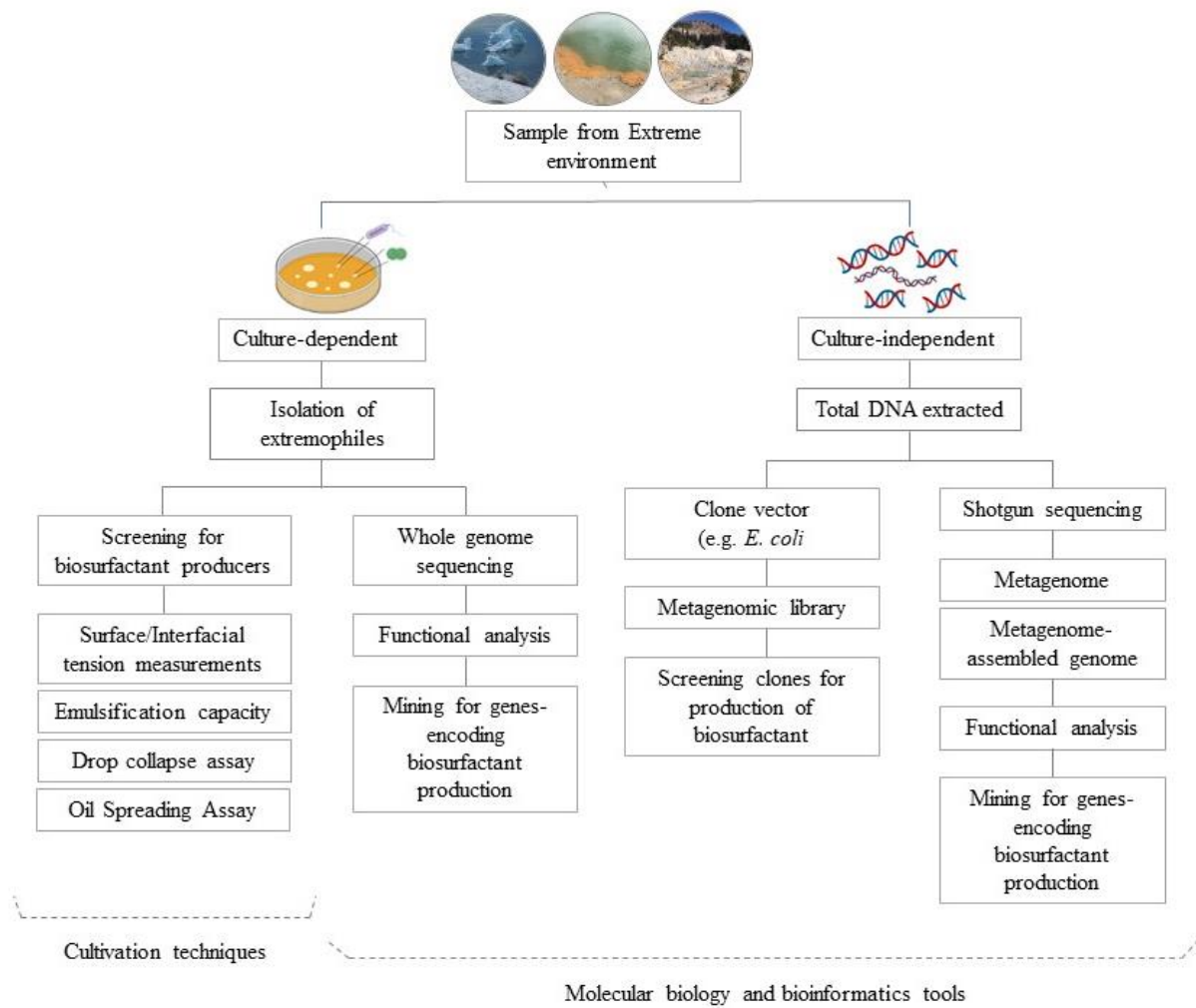


Fig. 3: Schematic representation of screening possibilities by microorganisms producing biosurfactants in culture-dependent and culture-independent methods. Source: Authors.

TABLE

Table. 1: Studies with biosurfactants produced by microorganisms isolated from extreme environments.

Biosurfactant	Microorganism	Environment	Extreme condition of the environment	Optimal growth (temperature, pH, salinity)	Range for growth (temperature, pH, salinity)	Suggested biotechnological application	Reference
Aneurinifactin	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> SBP-11	Gulf of Mannar, India	Halophilic	37 °C, pH 8.0	n.p	Pharmaceutical industries	Balan et al. (2017)
Glycolipids	<i>Achromobacter</i> sp. PS1, <i>Bacillus</i> sp. SLDB1	Oil reservoir, India	Thermophilic	30 °C, pH 6.5	n.p	Bioremediation processes	Joy et al. (2017)
Lipopeptides	<i>Ochrobactrum</i> sp. GREW1, <i>Bacillus</i> sp. SB2	Oil reservoir, India	Thermophilic	30 °C, pH 6.5	n.p	Bioremediation processes	Joy et al. (2017)
Unidentified	<i>Ochrobactrum intermedium</i> strain MZV101	Hot spring Gheyarnarje Nir, Ardebil, Iran	Thermophilic	70 °C, pH 10.0	70-90 °C, pH 10.0-13.0	Detergent industry	Zarinviarsagh et al. (2017)
Unidentified	<i>Bacillus licheniformis</i>	Zilaei oil reservoir, southwest of Iran	Thermophilic	37 °C, pH 7.0, 1% of salinity	40-70 °C, pH 7.0, 1-7% of salinity	MEOR	Daryasafar et al. (2016)
Unidentified	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> AJH1	Mining Company, Saudi Arabia	Acidophilic	30 °C, pH 2.0	30 °C, pH 2.0-5.0	Environmental wastewater treatment	Arulazhagan et al. (2017)
Unidentified	Mycobacteria AGS10	Astrakhan, Russia	Acidophilic	30 °C, pH 2.5	n.p	Unspecified	Ivanova et al. (2016)
Surfactin	<i>Bacillus asahii</i> , <i>B. detrensensis</i> , <i>Fictibacillus barbaricus</i> , <i>Paenisporosarcina indica</i>	Saline and hypersaline environments, Rio de Janeiro, Brazil	Halophilic	32 °C, 3.5% of salinity	n.p	MEOR and bioremediation processes	Couto et al. (2015)
Unidentified	<i>Haloarcula argentinensis</i> , <i>Haloarcula</i>	Colorada Grande and Salitral	Halophilic	37 °C, 25% of salinity	n.p	Pharmaceutical industries	Nercessian et al. (2015)

	<i>japonica</i> , <i>Haloarcula</i> <i>vallismortis</i> , <i>Halorubrum</i> <i>tebenquichense</i> , <i>Halobacterium</i> <i>salinarum</i> , <i>Halobacterium</i> <i>piscisalsi</i> , <i>Salinibacter ruber</i> , <i>Salicola</i> sp.	Negro, saltern in Argentina					
Unidentified	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus</i> sp.	Trindade Island, Brazil	Halophilic	37 °C, 5% of salinity	n.p	Oil industry (MEOR, bioremediation, cleaning of oil storage tanks and oil transport)	Silva et al. (2015)
Unidentified	<i>Natrialba</i> sp. C21	Solar saltern, Ain Salah, Algeria	Halophilic	40 °C, pH 7.0, 1.25% of salinity	50 °C, pH 4.0- 12.0, 5-35% of salinity	Bioremediation processes	Khemili-Talbi et al. (2015)
Lipopeptide	<i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i>	Niage field, Western desert, Egypt	Thermophilic	30 °C, pH 7.5	n.p	MEOR	El-Sheshtawy et al. (2015)
Unidentified	<i>Virgibacillus</i> <i>salaris</i>	Red Sea, Saudi Arabia	Alkalinophilic, Halophilic and Thermophilic	30 °C	25-60 °C, pH 4.0-12.0, 1-10% of salinity	Pharmaceutical, cosmetics and food industries and for bioremediation in marine environment	Elazzazy et al. (2015)
Lichenysin	<i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> AL 1.1	Deception Island, Antarctica	Thermophilic and Psychrophilic	30 °C, pH 7.0	30-60 °C	Cosmetics industry	Coronel-León et al. (2015)
Glycolipids	<i>Rhodococcus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Pseudoalteromonas</i>	Byers Peninsula, South Shetlands Islands (Antarctica) and the Kongsfjorden,	Psychrophilic	4 °C, pH 7.6, 3% of salinity	n.p	Unspecified	Malavenda et al. (2015)

	sp. and <i>Idiomarina</i> sp.	Svalbard Islands (Norwegian Arctic)					
Unidentified	<i>Bacillus</i> sp., <i>Paenibacillus</i> sp., <i>Sporocarcina</i> sp.	King George Island, Admiralty Bay, Antarctica	Psychrophilic	12 °C	4-32 °C	Unspecified	Vollú et al. (2014)
Unidentified	<i>Alcanivorax</i> , <i>Exiguobacterium</i> , <i>Halomonas</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i>	North Atlantic Canada	Psychrophilic	30 °C	n.p	Bioremediation processes	Cai et al. (2014)
Lipopeptide	<i>Kocuria marina</i> BS-15	Condenser pond of Kovalam, solar saltern, India	Halophilic	37 °C, pH 9, 10% of salinity	5-10% of salinity	Pharmaceutical industries	Sarafin et al. (2014)
Glycolipoprotein	<i>Oceanobacillus</i> sp. BRI 10	Antarctic coast	Psychrophilic	30 °C, pH 7.0	15-37 °C, pH 5.0-9.0	Food, pharmaceutical and cosmetics industry, and bioremediation processes	Jadhav et al. (2013)
Unidentified	<i>Haloferax volcanii</i> MSNC14	Hypersaline pond, Salins de Giraud, France	Halophilic	40 °C, pH 7.5, 22.5% of salinity	n.p	Unspecified	Djeridi et al. (2013)
Glycolipids, polymeric substances and lipopeptides	<i>Halomonas</i> sp. BS4	Solar saltern, Thamaraiikulam, India	Halophilic	37 °C, pH 6.0-8.0, 8% of salinity	15-45 °C, pH 5.0-10.0, 2-20% of salinity	Pharmaceutical industries	Donio et al. (2013)
Glycoproteins, glycolipids or lipopeptides	<i>Natrialba</i> sp.	Solar saltern, Ain Salah, Algeria	Halophilic	40 °C, pH 7.0, 12.5% of salinity	pH 5.0-10.0, 5-35% of salinity	Bioremediation processes	Kebbouche-Gana et al. (2013)
Ramnolipids	<i>Thermus aquaticus</i> CCM 3488, <i>Thermus</i> sp. CCM 2842, <i>Meiothermus ruber</i> CCM 4212	Czech Republic	Thermophilic	65 °C	n.p	Unspecified	Rezanka et al. (2011)

Pseudofactin II	<i>Pseudomonas fluorescens</i> BD5	Arctic Archipelago of Svalbard	Psychrophilic	28 °C	10-37 °C	Unspecified	Janek et al. (2010)
Unidentified	<i>Rhodococcus fascians</i> A-3	Wilkes Land, Antarctica	Psychrophilic and Halophilic	4 °C, pH 7.0	n.p	Bioremediation processes	Gesheva et al. (2010)
Peptidoglycolipid and glycoproteins	<i>Halovivax</i> sp. A21 <i>Haloarcula</i> sp. D212	Solar saltern, Ain Salah, Algeria	Halophilic	40 °C, pH 7.0, 15% of salinity	40-50 °C, pH 5.0-10.0, 5-35% of salinity	Oil industry (mobilizing heavy crude oil, oil pollution control, cleaning oil sludge from oil storage facilities, oil/sand bioremediation and MEOR)	Kebbouche-Gana et al. (2009)
Glycolipid	<i>Pantoea</i> sp. strain A-13	Dewart Island (Frazier Islands), Antarctica	Psychrophilic	25° C	4-28 °C	Unspecified	Vasileva-Tonkova et al. (2007)
Unidentified	Unidentified bacterial isolates	Czechowice Oil Refinery, Poland	Thermophilic	65° C	37-100 °C	MEOR and oil tank cleanups	Plaza et al. (2006)
Glycolipid	<i>Halomonas</i> sp. ANT-3b	Ross Sea, Antarctica	Psychrophilic and Halophilic	15 °C	4-30 °C	Unspecified	Pepi et al. (2005)
Unidentified	Unidentified bacterial isolates	Oil reservoirs, west of Iran	Thermophilic	30 °C, pH 7.2	n.p	MEOR and bioremediation processes	Tabatabaee et al. (2005)
Lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin, and surfactin	<i>Bacillus subtilis</i> BBK-1	Salty soils, sands, seawater, Thailand	Halophilic	30 °C, pH 7.5, 5% of salinity	n.p	Unspecified	Roongsawang et al. (2002)
Trehalose lipids	<i>Rhodococcus</i> sp. GA-05	Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica	Psychrophilic and Halophilic	30 °C	n.p	Bioremediation processes	Yakimov et al. (1999)
Lipopeptide	<i>Bacillus licheniformis</i> BAS 50	Oil reservoirs, Germany	Thermophilic and Halophilic	50 °C	n.p	MEOR	Yakimov et al. (1997)

n.p = not provided.

5.3 CAPÍTULO II

POLYPHASIC ANALYSIS REVEALS PETROLEUM HYDROCARBON DEGRADATION AND BIOSURFACTANT PRODUCTION OF RARE BIOSPHERE THERMOPHILIC BACTERIA FROM DECEPTION ISLAND, AN ANTARCTIC VOLCANO

Júnia Schultz¹, Isabella Campelo Vilardi Argentino¹, René Kallies², Ulisses Nunes da Rocha², Alexandre Soares Rosado^{1*}

¹ Laboratory of Molecular Microbial Ecology, Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

² Department of Environmental Microbiology, Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, Leipzig, Germany

* Correspondence:

Alexandre Soares Rosado
asrosado@micro.ufrj.br

Keywords: Extremophiles, Thermophiles, Polar volcano, Antarctica, Biosurfactants, Oil degradation, Bacterial isolation.

Abstract

Polar volcanoes harbor unique conditions of extreme temperature gradients capable of selecting different types of extremophiles. Deception Island is a marine stratovolcano located at Maritime Antarctica that is notable for its pronounced temperature gradients over very short distances, reaching values up to 100°C in the fumaroles, and subzero temperatures next to the glaciers. Due to these characteristics, Deception Island is an interesting source for a variety of bioproducts to apply in different biotechnological areas, such as, oil industry. In this study, we aimed to isolate thermophilic bacteria from sediments associated to fumaroles from two geothermal sites in Deception Island, comprising temperatures between 50 and 100°C. Further,

we evaluated the capacity of such isolates to degrade petroleum hydrocarbons and produce biosurfactants under thermophilic conditions. After incubation at 55°C for 48 h and 3 purification steps, 159 thermophilic bacterial strains were isolated, and their genus was identified based on their 16S rRNA gene sequence. The isolates were mainly affiliated to *Geobacillus*, *Anoxybacillus* and *Brevibacillus* within the Firmicutes phylum. Eighty-one of our isolates grew in medium culture supplemented with crude oil as only carbon source and 25 showed the higher degradation results in plate. From 50 strains tested for biosurfactant production, 14 showed the best results in the screening, presenting emulsification index of 50% or more in one of the petroleum hydrocarbons sources (crude oil and diesel) and emulsification stability at 100°C. Also, these strains showed positive results in drop-collapse, oil spreading and hemolytic activity. Of these, four isolates also showed the ability to degrade crude oil; respectively, FB2_38 (*Atopococcus*), FB3_54 (*Geobacillus*), FB4_88 (*Geobacillus*) and WB1_122 (*Anoxybacillus*). To determine if our isolates belong to the dominant bacteria from the sites where they were collected, we reconstructed the 16S rRNA gene from metagenomes recovered from the same sites in Deception Island. This analysis indicated that our isolates do not belong to the dominant fraction of the community. Our data suggest that thermophilic bacteria from the Antarctic polar volcano have the potential for application in the petroleum industry, for a possible extreme environment bioremediation approach and for microbial enhanced oil recovery (MEOR) in reservoir.

1 Introduction

Antarctica is characterized by being a mosaic of extreme ecosystem. These ecosystems are predominantly cold. However, Antarctica harbors four active volcanoes, three located in continental sites (Mount Erebus, Mount Melbourne, Mount Rittmann) and one in maritime Antarctica (Deception Island) (Herbold et al. 2014). These are unique volcano habitats, in particular Deception Island, a stratovolcano with fumarolic emissions, thermal springs and hot soils that can reach temperatures to 110°C and it is under marine influence (Caselli et al. 2004). These characteristics provide the ideal conditions and opportunities to select a versatile and extremely diverse community of thermophilic microorganisms.

The microbial diversity of Deception Island has been studied over the last decades. Previous studies on bacterial cultivation indicate the presence thermophilic bacteria belonging to *Geobacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* and *Thermus* genera (Muñoz et al. 2011; Bendia et al. 2018a). Through the development of DNA sequencing

technologies, several extremophiles-related sequences (psychrophiles, thermophiles and hyperthermophiles) were evaluated using metagenomic analysis and 16S rRNA gene amplicon sequencing. Bendia et al. (2018b) identified the prevalence of the phylum Proteobacteria (43,75%), followed by Bacteroidetes (17,11%) among environmental gradients in Deception Island (Bendia et al. 2018b). Phylum Firmicutes was represented with a relative abundance of 0,38%.

Metagenomic approaches, in which the total DNA is completely sequenced (Kunin et al. 2008), have been used to investigate microbial communities and their functions in different extreme environments, such as thermal pools (Wilkins et al. 2019), desert biological soil crusts (Nunes da Rocha et al. 2015), permafrost (Woodcroft et al. 2018) and Antarctic mat and soil (Zaikova et al. 2019). Near-complete genomes have been assembled from shotgun-sequenced metagenomes of these environments. Though, it has been difficult to assemble genomes for populations below 1% relative abundance using current metagenome sequencing and assembly approaches (Albertsen et al. 2013). Using these approaches, only genomes of the dominant taxa are recovered from a low complexity microbial community (Tyson et al. 2004).

Despite the advent of omics analysis, cultivation studies are still relevant to assess the physiological properties of bacterial cells and to estimate limits of detection of independent-culture methods (Prakash et al. 2013; Nunes da Rocha et al. 2015). In addition, it allows us to understand their survival strategies, metabolic adaptations and to explore them as potential candidates to apply in different areas of biotechnology (Satyanarayana et al. 2013).

Bacterial thermophiles are a source of different kinds of bioproducts. However, to date only a few studies attempted to isolate thermophilic microorganisms from Deception Island, Antarctica, to assess their potential use in industrial processes. Two studies were developed by Muñoz et al. (2013, 2015) and had the objective of exploring the production of lipases from previously cultivated bacterial isolates belonging to the genus *Geobacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* and *Thermus*. It has also been partially characterized a thermophilic microorganism identified as *Bacillus gelatini*, which showed a stable glutamate dehydrogenase activity in high temperature (Flores et al. 2018). Márquez and Blamey (2019) isolated a new thermophile identified as *Albidovulum* sp. SLM16 presenting aminotransaminase activity.

The discovery and study of new microorganisms from this extreme continent, particularly thermophiles, is important not only for the contribution to the knowledge of microbial biodiversity but also as a source of novel biocompounds with potential use in industrial, medical and commercial applications (Perfumo et al., 2018). Due to their thermal and chemical stability as well as structural and molecular modifications, thermophiles can be used for processes that require high temperatures, e.g. bioenergy, bioconversion, pharmaceutical, medical, detergent, agriculture and oil industry (Rampelotto, 2016; Straub et al. 2017).

In oil industry, thermophiles have been received increasing attention for two main applications: microbial enhanced oil recovery (MEOR), a tertiary oil recovery technique (Marchant and Banat 2012), and bioremediation of extreme environments contaminated by crude oil and its derivatives (Sobrinho et al. 2013). For bioremediation strategies, it is necessary to know the structure and diversity of the microbial community present in the contaminated site capable of degrading petroleum hydrocarbons, because the effectiveness of bioremediation will depend on the functionality of indigenous microorganisms in degrading the oil compounds. Also, in produce substances that aid in these processes, such as biosurfactants – amphipathic organic molecules with tensioactive and emulsification action (Pacwa-Płociniczak et al. 2011).

Extreme biosurfactants (e.g. biosurfactant from thermophiles) can be potentially applied in MEOR, due to the ability to be an active and stable molecule in high temperature, as founded in oil reservoirs (Cameotra and Makkar 1998). Thus, there is a need to bioprospect more hostile environments, especially geothermal environments with high temperatures, similar to the oil reservoir, which may reveal microorganisms to be harnessed in MEOR.

Here, we hypothesize that bacteria isolated from thermophilic Antarctic sediments contain as-yet-undescribed and biotechnologically relevant metabolic capacities, such as for oil degradation and biosurfactant production that are screenable in tests and reveal insights for potential application in oil industry. To test this hypothesis, this study aimed to isolate thermophilic bacteria from sediments associated to fumaroles from two geothermal sites in Deception Island, comprising temperatures between 50 and 100 °C with the purpose to evaluate their capacity to

degrade petroleum hydrocarbons and produce biosurfactants/bioemulsifiers under thermophilic conditions. Finally, we relate the phylogenetic relationship of the isolates recovered in this study to those of the reconstructed SSU rRNA gene sequences from metagenomes of the same sampling site, to determine what fraction of the bacterial diversity was recovered by isolation using simple modifications to existing cultivation methods.

2 Material and methods

2.1 Study site and sampling strategy

Sampling was performed during the XXXIV Brazilian Antarctic Expedition (December 2015–January 2016) in Deception Island volcano, Antarctica, at the geothermally active sites of Whalers Bay (WB) (-62.979611, -60.555778) and Fumarole Bay (FB) (-62.967417, -60.710111) (Fig. 1a, 1b). In Whalers Bay, samples were collected in fumaroles with temperatures of 50°C (WB1) and 60°C (WB2) (Fig. 1c). In Fumarole Bay, we collected samples in fumaroles with temperatures of 55°C (FB1), 70°C (FB2), 80°C (FB3), and 100°C (FB4) (Fig. 1d). Distances between the fumaroles were less than 2 m. Whalers Bay and Fumarole Bay transects were approximately 10 km apart. All fumaroles were in the intertidal zone, with exception of fumarole with 80°C from Fumarole Bay (FB3), which was in the subtidal zone (submerged at 50 cm depth in the water column).

Approximately 500 g of sediment were collected from each sampling point, from 0 to 5 cm depth. The samples were placed in sterile plastic bags and immediately transferred to the laboratory, where they were stored at 4°C until arrival at the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil, in April 2016.

2.2 Isolation of thermophiles from environmental samples

Summary of the experimental design is available from the Supplementary Figure 1. To isolate thermophiles from the fumaroles in Deception Island, we inoculated the samples in six different culture media at 55°C growth temperature. First,

sediment samples were homogenized, and 10 g were added to 90 mL of saline solution (0.85%) with glass beads and agitated for 2 h. Serial tenfold dilutions (10^{-1} - 10^{-3}) were prepared in the same diluent and triplicates (0.1 mL of each dilution) were spread six different culture agars. The different media used for isolation were lysogeny agar (Bertani 1951), marine agar (Zobell 1941), glyucose yeast malt (Mendez et al. 1985), DSMZ 260 medium (DSMZ GmbH), calcium phytate medium (Richardson et al. 2001) and NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate) medium (Nautyal 1999). Plates were incubated at 55°C for 48h.

After incubation, we randomly selected three colonies of each culture for isolation procedure. A total of 159 colonies were successfully isolated after purification and then selected for subsequent molecular analyses. The pure strains were stored at -80°C with 20% v v^{-1} of glycerol and deposited in the Antarctic Culture Collection of Microbial Molecular Ecology Laboratory, in Federal University of Rio de Janeiro.

2.3 DNA extraction, 16S rRNA gene sequence analysis and taxonomic identification

Samples were cultured in lysogeny broth for 48 h, at 55°C and constant shaking. Bacterial genomic DNA was extracted using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. Isolates were taxonomically identified based on their 16S rRNA gene sequence. A 1450-bp long fragment of the bacterial 16S rRNA gene was amplified using primers 27F (5'-AGA-GTT-TGA-TCM-TGG-CTC-AG-3') and 1492R (5'-TAC-GGY-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T-3') (Lane, 1991). The PCR reaction consisted of 10 pM of each primer, 10 ng of DNA, Bovine serum albumin (1:20), 2x MyTaq® reagent containing buffer Taq polymerase, dNTPs and MgCl₂ (Bioline, USA) in a final volume of 25 μ L. The amplification was performed in a thermocycler with an initial denaturation at 95°C for 3 min, followed by 25 cycles at 95°C for 30 sec, 55°C for 30 sec and 72°C for 30 sec, and a final extension at 72°C for 5 min. PCR products were purified using the SureClean Plus reagent (Bioline, USA). DNA amount of purified amplicons were quantitated with Qubit 4.0 with the Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, USA) and examined by electrophoresis on 1.5% agarose gels. Approximately 25 ng of

each amplicons were sent for sequencing using Sanger's chain termination technique (Eurofins, Göttingen, Germany) (Sanger et al. 1977).

Sequences were quality trimmed, primer sequences were clipped and contigs were produced by merging overlaps from both, the forward and reverse sequence, using Geneious Prime®. All sequences were deposited in National Center for Biotechnology Information Sequence Read Archives under Bioproject number PRJNA554144.

2.4 Metagenome sequencing

The DNA used to perform the metagenomic sequencing was extracted from samples collected in the same area as was used for bacterial isolation. DNA extraction was performed using PowerMax Soil™ DNA (MoBio, USA), following the manufacturer's protocol. The extracted DNA was concentrated and purified using OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit™ (Zymo Research, USA), and further quantified using Qubit dsDNA HS Assay (Thermo-Fisher Scientific, United States) and Qubit Fluorimeter 1.0 (Thermo-Fisher Scientific, United States). Approximately 2 µg of DNA were obtained after amplification using Illustra™ GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Health Life Sciences, USA). DNA was purified using the AMPure XP beads kit (Beckman Coulter, USA) and sent to Central Laboratory of High-Performance Technologies in Life Sciences, Unicamp, Brazil, where the libraries were prepared sequenced on an Illumina HiSeq 2500 platform on three lanes using 2 x 100 bp paired-ends.

Reads were quality-checked using SICKLE software (Joshi and Fass 2011) with a minimum Phred score of 30. Metagenomics RAST server (MG-RAST) provides a sequence quality control by removing duplicate sequences and selecting sequences larger than 80 bp and Phred score greater than 30 for analysis (Meyer et al. 2008). All the metagenomic sequences were deposited in the MG-RAST server under accession numbers mgm4670271-mgm4670288.

2.5 Reconstruction of SSU of rRNA genes from metagenome reads and comparisons of SSU rRNA genes from isolates

Near-full-length SSU rRNA sequences were reconstructed from metagenomes sequences with MATAM (Mapping-Assisted Targeted-Assembly for Metagenomics) (Pericard et al. 2018). Paired-end reads where both reads were at least 60 nucleotides in length after trimming were used as inputs. The reads were mapped to the release 132 of the Silva SSU Ref NR database (Quast et al. 2013), clustered at 97% similarity, using the tool SortMeRNA (Kopylova et al. 2012). To the SILVA database v.132, we added the SSU rRNA gene sequences of the isolates cultivated in this study. Chimeric sequences were removed by UCHIME algorithm (Edgar et al. 2011) implemented in VSEARCH (Rognes et al. 2016) and querying the Silva 132 SSU Ref database.

We attempted to determine the bacterial fraction of the metagenomes that were also recovered by cultivation. For that, we clustered sequences with more than 97% similarity here defined as the same Operation Taxonomic Unit (OTU). To determine which sequences were more than 97% similar, we used the tool UCLUST from the USEARCH package (Edgar 2010) where we clustered the SSU rRNA gene sequences of all isolates with those of the SSU rRNA genes reconstructed from metagenomes. Briefly, the fasta files containing the sequences of all isolates were concatenated into the fasta files containing the ribosomal sequences reconstructed by MATAM. Sequences were then sorted by length prior to OTU clustering using UCLUST.

The fractional abundance of the microbial diversity in the metagenomes that also was represented in our isolate pool was denoted as the sum of the relative normalized abundance of the different reconstructed OTUs that were more than 97% similar to the SSU rRNA genes of isolates. The isolate with the longest sequence was chosen as cluster representative when comparing isolates and metagenomes.

As MATAM reconstructed SSU rRNA genes are hypothetical sequences, they were not submitted to a public database.

2.6 Screening for oil-degrading thermophilic bacteria

We randomly selected 100 isolates previously taxonomically identified through 16S rRNA gene sequencing to test their capacity to degrade petroleum hydrocarbons to use as a carbon source. We reactivated the strains in LB broth medium at 55°C for 48 h in constant agitation, and then, a total volume of 100 µL of each culture was transferred to plates containing solid Bushnell-Haas (BH) medium medium (0.02 g L⁻¹ CaCl₂ x 2 H₂O, 0.2 g L⁻¹ MgSO₄ x 7 H₂O, 1 g L⁻¹ K₂HPO₄, 1 g L⁻¹ KH₂PO₄, 1 g L⁻¹ NH₄NO₃, 0.05 g L⁻¹ FeCl₃ x 2 H₂O, 1 g L⁻¹ agar) supplemented with 2% of crude oil (Atlas, 1995). Isolates that showed growth on plate with BH supplemented with oil were enriched in BH broth supplemented with yeast extract (2%) at 55°C for 48 h and submitted to the oil drop test in well-plate, as described by Youssef et al. (2004) – a qualitative test of degradation (Supplementary Figure 1).

Briefly, the cells were centrifuged and resuspended in saline solution (0.85%) to remove any remaining carbon source remnants in the medium. Cells were resuspended in 5 mL of saline and inoculated into wells of 24 well-plates, where in each well 2 mL of BH broth medium were deposited, 20 µL of crude oil and 160 µL bacterial suspension of each isolate. All inoculations were performed in triplicates, including negative control (BH broth with oil and without inoculation) and positive control (*Geobacillus* sp.), and incubated at 55°C, with observation for up to 21 days. Results were considered positive when the oil aspect changed in visual comparison with the controls.

2.7 Screening for biosurfactant production

In order to verify the capacity for biosurfactant production by thermophilic oil-degrading bacteria, 50 isolates were randomly selected based on the positive results of oil-degraders. Bacteria were grown aerobically in 250 mL Erlenmeyer flask with 100 mL of BH broth supplemented with 2% yeast extract and were maintained at a shaker at 55°C for 7 days with constant shaking (165 rpm) (Mani et al. 2016). After incubation, the bacterial culture from each flask was centrifuged for 15 minutes at 13,000xg and

the cell-free culture supernatant was used for the screening assays. All the screening experiments were performed in triplicates and the mean values were used as results.

2.7.1 Drop-collapse test

The drop-collapse test followed the protocol proposed by Jain et al. (1991). One crude oil drop was pipetted on a glass slide and 10 μ L of the bacterial culture supernatant was added onto the oil surface. The same was performed for the controls (SDS 1% as positive control and distilled water as negative control). When the oil drop became flat 1 min after adding of the supernatant, the result was taken as to be positive, otherwise, it was scored as negative.

2.7.2 Oil spreading assay

This assay was performed as described by Morikawa et al. (2000). Briefly, an aliquot of 10 μ L of oil was added to a Petri dish containing 40 mL of distilled water, forming a thin layer of oil. Then, an aliquot of 10 μ L of the supernatant from each isolate and positive and negative controls (as mentioned in 2.7.1) were added to the center of the oil layer. The diameter of the clear zone on the oil surface was measured and compared with those on the negative and positive controls.

2.7.3 Hemolysis test

The hemolysis test was carried out as described by Mulligan et al. (1984), where 10 μ L of the supernatant culture and controls (as mentioned in 2.7.1) were inoculated as spots on Petry dish containing blood agar medium (5% defibrillated sheep's blood - Laborclin®). The plates were incubated for 48 h at 55°C and after the incubation period, in the presence of a clear halo (hemolysis zone), the result was considered positive for biosurfactant production.

2.7.4 Emulsification assay

The emulsification assay was performed according to Cooper and Goldenberg (1987), using crude oil and diesel. Cell-free culture broth (200 μ L) was transferred to a glass tube containing 600 μ L of distilled water and 1.2 mL of crude oil or diesel. The supernatant-water-oil mixture was shaken for 2 min in vortex and the results were analyzed after 24 h, applying the emulsification index (EI) calculation: $EI (\%) = (\text{height of the emulsion layer} / \text{total height}) \times 100$. The same procedure was performed with the controls.

The resistance and stability of the biosurfactant against heat were evaluated by heating the supernatant at 100 °C for 15 minutes (Couto et al. 2015) and submitted to the emulsification assay with crude oil and diesel.

3 Results

3.1 Thermophiles isolated from Deception Island and molecular identification

We attempted to purify 245 thermophilic bacterial strains growing at 55°C from all media. From those, 159 were successfully purified to single colonies, isolated from two geothermal environments of Deception Island, 38 strains from Whalers Bay and 121 strains from Fumarole Bay. The largest number of strains (60 isolates) were recovered from FB4, a Fumarole Bay's sample, where the environmental temperature was 100°C (Supplementary Table 1).

Firmicutes were the only one bacterial phylum that the sequences of the 16S rRNA gene of 159 isolates were affiliated. The majority of isolates was assigned to the genus *Geobacillus* (36.5%, 58 isolates), followed by *Brevibacillus* (17%, 27 isolates), *Anoxybacillus* (23.3%, 37 isolates) and Unclassified (22.6%, 36 isolates), and only 1 strain of the genus *Atopococcus*, isolated from FB2 (70°C). *Geobacillus*-related isolates could be found in every collection site and were predominant in the fumaroles hotter than 80°C. However, *Brevibacillus* was not isolated from FB3 (80°C), but it was representative in samples from Whalers Bay (Fig. 2).

3.2 Representation of isolates within the thermophilic bacterial community: Comparison between isolates and metagenomes

To determine what fraction of the total phylotype diversity (OTUs weighted by relative abundance in the community) in our metagenomes was recovered as isolates, we determined the overlap between isolate sequences and OTUs derived from metagenome sequences. It was recovery 52 rRNA 16S from the metagenomes and was observed two representants of phylum Firmicutes (genera *Sporosarcina* and *Murdochiella*) (Fig. 3) and no matches with the genera isolated from the sediment. This result indicate that the isolates cultivated are not dominant in the samples and the cultivation methods used, selected a specific part of the bacterial community.

3.3 Screening of oil-degrading bacteria and biosurfactant producers

A large fraction of our thermophilic isolates from Antarctica showed potential to degrade crude oil and to use it as a carbon source. Of the 100 thermophilic strains tested, a total of 81 isolates grew in culture medium containing oil as the only carbon source, showing potential for the degradation of petroleum hydrocarbons (Tab. 1). The 81 isolates were submitted to the drop test, in which 31 showed good degradation results when compared visually with the controls. From them, nine strains showed the best results, seven of them were identified as *Geobacillus* from Fumarole Bay (FB3_47, FB3_50, FB3_54, FB4_79, FB4_85, FB4_88, FB4_93), one isolate was identified as *Atopococcus* from Fumarole Bay (FB2_38) and one isolate belonged to *Anoxybacillus* genus, from Whalers Bay (WB1_122) (Fig. 4a).

For the screening of biosurfactant production, 50 isolates capable of degrading oil were tested by different methodologies (Tab. 2). Emulsification tests were performed using crude oil and diesel. Sixty six percent of the thermophilic isolates (33 out of 50) were able to emulsify at least one of the hydrocarbons used. Emulsion values (%) of the strains using crude oil were mainly higher than those obtained with diesel, except for the FB4_89 strain (*Geobacillus*), that showed higher emulsification index in diesel (EI=56% in diesel and 35% in crude oil). In total, 24 of the 50 isolated thermophilic bacterial strains presented and IE% higher than 30%, being 21 from

Fumarole Bay and 3 from Whalers Bay. The great majority of strains presenting EI% higher than 30% belonged to the genus *Geobacillus*, and most of them from the Fumarole Bay environment, 12 isolates from a total of 13, followed by *Anoxybacillus* with 8 isolates (2 from Whalers Bay). Strains belonging to other genera were found only in Fumarole Bay, one *Atopococcus* strain and one unclassified strain (Fig. 4b).

Biosurfactant producing isolates that showed emulsification higher than 30% in the E24 assay were also tested for emulsification stability at high temperature (100°C). For this analysis, 24 samples were tested in tubes containing crude oil and diesel. Emulsion values (%) of strains using crude oil were usually higher than those obtained with diesel at 100°C. Biosurfactant stability in crude oil presented better results (Fig. 4b) in strains isolated from sediments of geothermal environments with higher temperatures (FB3 and FB4), with a decrease in emulsification index in strains isolated from other sampled environments of this study. For the biosurfactant stability in diesel at 100°C, the results were similar or higher to those found at room temperature, indicating a higher emulsifying activity at high temperatures, however, it was not higher than observed for crude oil. Promising results for crude oil and diesel emulsification at room temperature and high temperature (100°C) were obtained from strains FB2_38, FB4_88, FB4_89, FB4_81, FB4_119 and WB2_153 (Tab. 2).

All strains that did not show emulsification activity also presented negative results in drop-collapse, oil spreading and hemolytic activity tests. From the 50 thermophilic strains analyzed, 62% were positive for oil spreading assay and 40% positive for drop-collapse test. For hemolytic activity, 42% of the isolates showed positive results in blood agar plates, with *Geobacillus* being the genus that predominantly presented hemolytic activity (n = 12) (Tab. 2).

In total, 14 thermophilic isolates showed the best results in the search for biosurfactant producers, with IE of at least 50% in one of the petroleum hydrocarbon source, positive results in the other methodologies applied and high temperature emulsification stability, corresponding to the isolated strains of Fumarole Bay (n = 11): FB2_36, FB2_38, FB2_49, FB3_54, FB4_67, FB4_68, FB4_88, FB4_91, FB4_101, FB4_105, FB4_119, and Whalers Bay (n=3): WB1_122, WB1_128 and WB2_153. Of these, 4 isolates also showed the ability to degrade crude oil: FB2_38, FB3_54,

FB4_88 and WB1_122, identified as belonging to the genera *Atopococcus*, *Geobacillus*, *Geobacillus* and *Anoxybacillus*, respectively.

4 Discussion

Here, we report the first attempt to assess the cultivated thermophilic bacteria from Deception Island volcano with capacity to degrade petroleum hydrocarbon and produce biosurfactant under thermophilic conditions. To this end, we isolated 159 bacteria from two geothermal sites using different culture media, and based on the phylogenetic analysis, all isolates were affiliated to Firmicutes. The bacterial phylum Firmicutes contains members with different morphological and physiological characteristics, and the formation of heat-resistant endospores is a specific property of Firmicutes, which makes them able to inhabit extreme environments, such as Antarctic volcano.

Partial sequencing of the 16S rRNA gene revealed that the 159 cultured thermophilic isolates belong mainly to the genera *Geobacillus*, *Brevibacillus* and *Anoxybacillus*. These groups have been previously described in sediments associated with fumaroles from Deception Island (Llarch et al. 1997; Muñoz et al. 2011), as well as in glaciers present in these locations (Bendia et al. 2018a). Additionally, several species of *Bacillus*, *Alicyclobacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus* and *Anoxybacillus* have been isolated from other geothermal environments in Antarctica (Bargagli et al. 2004). We also isolated an *Atopococcus* strain, grown under aerobic conditions and Marine agar culture medium from the Fumarole Bay sediment, where the ambient temperature was 70°C. The genus *Atopococcus* has only one known species, *Atopococcus tabaci*, which is aerobic, halotolerant and non-spore (Collins et al. 2005). Also, it was observed in the present study that 22% of the isolates could not be affiliated to a known taxon (unclassified), suggesting that they may possibly be novel species, and an effort should be made to further describe and classify new and poorly characterized bacteria into appropriate taxa.

We tested the isolates for their ability to degrade crude oil to use as a carbon source, and over 50% of the isolates were able to grow in oil under thermophilic condition. Firmicutes also exhibit petroleum hydrocarbon degrading bacterial groups

and have been widely observed in abundance in oil-contaminated environments (Beazley et al. 2012; Engel et al. 2017). Species found among the isolates from Deception sediments are also well known as to be capable of degrading petroleum hydrocarbons. The genus *Geobacillus* is widely distributed in different environments, especially at high temperatures, such as geothermal environments and oil reservoirs. Many species of the genus *Geobacillus* have recently been described as degraders of different hydrocarbons and may use a wide variety of hydrocarbons, especially crude oil, kerosene and phenanthrene (Marchant and Banat 2010). Bacterial strains of *Brevibacillus* and *Anoxybacillus* have also been identified as hydrocarbon degraders under thermophilic condition (Xia et al. 2015), such as *Brevibacillus* sp. PDM-3 that degraded phenanthrene as a carbon source (Reddy et al. 2010).

We also tested the ability of thermophilic bacterial isolates to produce biosurfactant. These amphipathic molecules from extreme environments are increasingly being investigated for potential application in bioremediation and MEOR processes, as they are sustainable alternatives to chemical surfactants and exhibit activity and stability under extreme conditions (Darvishi et al. 2011). The results showed that 14 of the 50 strains tested were considered biosurfactant producers, presenting good emulsification property (IE > 50%) of crude oil and diesel. Good emulsification is essential for biosurfactants to be considered promising for environmental and industrial applications (Banat et al. 2000). In addition, other properties of biosurfactants, such as oil drop-collapse and oil spreading, and hemolytic activity, were tested. As previously observed by Couto et al. (2015), a close relationship was not observed in these tests, in which strains that presented emulsification ability did not show significant results in oil spreading or hemolytic activity.

Biosurfactant production was found in all identified genera, being *Geobacillus* the predominant genus. In a previous review, Marchant and Banat (2010) mention that no studies have been reported showing biosurfactant production by *Geobacillus* species, showing that studies with these microorganisms are very recent. Xia et al. (2016) isolated a new strain of *Geobacillus*, which showed biosurfactant production and high emulsification rates in different petroleum hydrocarbons (e.g. crude oil, kerosene and hexane). For strain *G. thermoleovorans* Ir1 a maximum crude oil emulsification of 68% was observed (AL-Jailawi et al. 2015). Jara et al. (2013) isolated *G. stearothermophilus*

from an oil contaminated soil that produced biosurfactant with 87% emulsifying activity for oil. The results found in the present study corroborate with those found in the literature, in which *Geobacillus* has a high potential for application in bioremediation of oil contaminated environments and MEOR.

Good emulsification capacity of isolates belonging to genera *Anoxybacillus* and *Brevibacillus* has also been reported. According to Pakpitcharoena et al. (2008), the production of biosurfactants by thermophilic isolates of *Anoxybacillus* is very scarce. One of the papers reporting *Anoxybacillus* biosurfactant was developed by Xia et al. (2015), in which *Anoxybacillus* sp. WJ-4 showed the production of an oligosaccharide – lipid – peptide bioemulsifier and exhibited a higher emulsification index of 60%. *Brevibacillus brevis* strain was isolated from an oil reservoir and produced lipopeptide-classified biosurfactant with 80% emulsification index (Mouafi et al. 2016). The isolate identified as *Atopococcus* also showed the ability to grow in crude oil and produce biosurfactant in thermophilic condition, to our knowledge the first report for these abilities in this genus, requiring further tests to confirm this metabolic potential.

Emulsification remained stable under high temperature condition. This feature is widely observed in biosurfactants, which are generally more effective under conditions of high salinity, pH and temperature compared to synthetic surfactants (Cameotra et al. 2010). High temperature is a key parameter affecting emulsifying activity and oil reservoirs present this condition (Uad et al. 2010), being a desired feature for MEOR.

As observed for the potential degradation of crude oil, biosurfactant production, and high temperature emulsification stability by members of the phylum Firmicutes in the present study, it is noteworthy that Firmicutes is not commonly found in substantial proportion in Antarctic environments (Bottos et al. 2014). The same result was observed in Deception Island through the recovery of the 16S gene from metagenomic samples. of the samples were rather dominated by Protobacteria and Bacteroidetes, what confirms data from Bendia et al. (2018b), who analyzed the microbial community through 16S rRNA gene sequencing.

Through these sequencing techniques (amplicon and metagenomics), it is possible to sequence all the DNA present in the sample and obtain information from the present microorganisms. However, it is known that it is difficult to obtain the genomic information of low abundant microorganisms (Tyson et al. 2004; Albertsen et

al. 2013). It has been suggested that Firmicutes, by unrepresentatively in independent culture analyzes, is not the dominant phylum in Deception Island sediments and may become dominant under optimal growing conditions or under some environmental interference (e.g. oil contamination).

Thus, it is concluded that, through cultivation techniques, thermophilic isolates were obtained from two geothermal environments of Deception Island at temperatures ranging from 50 to 100°C, and identified as belonging mainly to the genera *Geobacillus*, *Anoxybacillus* and *Brevibacillus*, which are bacterial spore-forming genera, suggesting the importance of spore formation for the local resistance. Thermophiles capable of degrading petroleum and producing biosurfactants have been described for the first time on Deception Island, an active Antarctic polar volcano, with four strains with the most promising results: FB2_38 (*Atopococcus*), FB3_54 (*Geobacillus*), FB4_88 (*Geobacillus*) and WB1_122 (*Anoxybacillus*).

In addition, according to Lynch and Neufeld (2015), it has been reported that the rare biosphere rate in a given environmental has important ecological roles and are reservoirs of genetic and functional diversity. It was reported here that non-dominant microorganisms can potentially play an important role in hydrocarbon degradation and biosurfactant production in the Deception Island volcano sediments. These initial data suggest that thermophilic bacteria from the Antarctic polar volcano have the potential to be further exploited for application in the petroleum industry, for a possible extreme environment bioremediation approach and for microbial enhanced oil recovery (MEOR) in reservoir.

5 Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships and that there is no potential conflict of interest.

6 Author Contributions

Study conception and design: JS, UNR, ASR; Acquisition of data: JS, ICVA, RK; Analyses and interpretation of data: JS, ICVA, UNR, ASR; Drafting of the manuscript: JS, UNR, ASR; Critical revision by all authors.

7 Funding

This work received financial support from the National Council for Research and Development (CNPq), National Council for the Improvement of Higher Education (CAPES) and Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ. Dr. Ulisses Nunes da Rocha is financed by the Helmholtz Young Investigator grant VH-NG-1248 Micro ‘Big Data’.

8 Acknowledgments

A special thanks to Vivian H. Pellizari and Amanda Gonçalves Bendia (Microsfera Project, University of São Paulo) for collecting samples in Deception Island and for providing the metagenomes raw data. Additionally, to the Brazilian Antarctic Program for logistical support during the Antarctica Operation. We are also grateful to Nicole Steinbach and Rodolfo Toscan from Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ for excellent technical assistance.

9 References

- Albertsen M., Hugenholtz P., Skarshewski A., Nielsen KL., Tyson GW, Nielsen PH. (2013) Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. *Nat Biotechnol* 31:533
- AL-Jailawi MH., NASIR HM., AZIZ GM. (2015) Characterization of Biosurfactant Produced by a Novel Thermophilic Strain (*Geobacillus thermoleovorans* JQ 912239). *Asian Journal of Biotechnology* 7:96-107.
- Atlas RM. (1995) Bioremediation of petroleum pollutants. *Int Biodeterior Biodegr* 35:317-327.

- Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS. (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:495-508.
- Bargagli R., SKOTNICKI ML., MARRI L., PEPI M., MACKENZIE A., AGNORELLI C. (2004) New record of moss and thermophilic bacteria species and physico-chemical properties of geothermal soils on the northwest slope of Mt. Melbourne (Antarctica). *Polar Biology* 27:423-431.
- Beazley MJ, Martinez RJ, Rajan S, Powell J, Piceno YM, et al. (2012) Microbial Community Analysis of a Coastal Salt Marsh Affected by the Deepwater Horizon Oil Spill. *PLOS ONE* 7:11.
- Bendia, A.G., Araujo, G.G., Pulschen, A.A., Contro, B., Duarte, R.T.D, Rodrigues, F., Galante, D., Pellizari, V.H. (2018a) Surviving in hot and cold: psychrophiles and thermophiles from Deception Island volcano, Antarctica. *Extremophiles* 22:917.
- Bendia, A.G., Signori, C.N., Franco, D.C., Duarte, R.T.D., Bohannan, B.J.M., Pellizari, V.H. (2018b) A mosaic of geothermal and marine features shapes microbial community structure on Deception Island volcano. *Antarctica. Front Microbiol* 9:899.
- Bertani, G. (1951) Studies on lysogeny. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* 62:293-300.
- Bolger AM., Lohse M., Usadel B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114-20.
- Bottos EM., Scarrow JW., Archer SDJ., McDonald IR., Cary SC. (2014) Bacterial community structures of Antarctic soils. In: Cowan, D. (Ed.). *Antarctic terrestrial microbiology*. New York, Springer, p. 9-33.
- Cameotra SS., Makkar RS. (1998) Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl. Microbiol Biotechnol* 50:520-529.
- Cameotra SS., Makkar RS., Kaur J., Mehta SK. (2010) Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. *Adv Exp Med Biol* 672:261-280
- Caselli, A.T., Santos-Afonso, M., Agosto, M.R. (2004) Gases fumarolicos de la isla Decepcion (Shetland del Sur, Antartida): Variaciones quimicas y depositos vinculados a la crisis sismica de 1999. *Asoc Geol Argent Ver* 59:291-302.
- Collins MD., Wiernik A., Falsen E., Lawson PA. (2005) *Atopococcus tabaci* gen. nov., sp. nov., a novel Gram-positive, catalase-negative, coccus-shaped bacterium isolated from tobacco. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1693-6.
- Cooper DG., Goldenberg BG. (1987) Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology* 53(2):224-229.
- Couto CRA., Alvarez VM., Marques JM., Jurelevicius D.A., Seldin L. (2015) Exploiting the aerobic endospore-forming bacterial diversity in saline and hypersaline environments for biosurfactant production. *BMC Microbiology* 15:240.
- Nunes da Rocha U., Cadillo-Quiroz H., Karaoz U., Rajeev L., Klitgord N., Dunn S., Truong V., Buenrostro M., Bowen BP., Garcia-Pichel F., Mukhopadhyay A., Northen TR., Brodie EL. (2015) Isolation of a significant fraction of non-phototroph diversity from a desert Biological Soil Crust. *Front Microbiol* 6:277.

- Darvishi P., Ayatollahi S., Mowla D., Niazi A. (2011) Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPPI-2. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 84:292-300.
- Edgar RC. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460-2461.
- Edgar RC., Haas BJ., Clemente JC., Quince C., Knight R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27:2194-2200.
- Engel AS., Liu C., Paterson AT., Anderson LC, Turner R.E., Overtone EB. (2017) Salt Marsh Bacterial Communities before and after the Deepwater Horizon Oil Spill. *Applied and Environmental Microbiology* 83:e00784-17.
- Flores PAM., Correa-Llanté D.N., Blamey JM. (2018) A thermophilic microorganism from Deception Island, Antarctica with a thermostable glutamate dehydrogenase activity. *Biol Res* 8:55.
- Herbold CW., McDonald I., Cary C. (2014) Microbial Ecology of Geothermal Habitats in Antarctica. In: Cowan D (ed) *Antarctic Terrestrial Microbiology*. Springer, Berlin Heidelberg, pp 181-215.
- Jain DK., Collins-Thompson DL., Lee H., Trevors J.T. (1991) A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 13:271-279.
- Jara AM., Andrade RF., Campos-Takaki GM. (2012) Physicochemical characterization of tensio-active produced by *Geobacillus stearothermophilus* isolated from petroleum-contaminated soil. *Colloids Surf B Biointerfaces* 1:315-8.
- Joshi N.; Fass J. (2011) Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33).
- Kopylova E., Noé L., Touzet H. (2012) SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics* 15:3211-7.
- Kunin V., Copeland A., Lapidus A., Mavromatis K., Hugenholtz PA. (2008) A bioinformatician's guide to metagenomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72:557-578.
- Lane DJ. (1991) 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, New York, pp 115-175.
- Llarch A., Logan N., Castellvi J., Prieto M., Guinea, J. (1997) Isolation and characterization of thermophilic *Bacillus* spp. from geothermal environments on Deception Island, South Shetland Archipelago. *Microbial Ecol* 34:58-65.
- Lynch M., Neufeld J. (2015) Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nature reviews* 13:3400.
- Mani P., Dineshkumar G., Jayaseelan T., Deepalakshmi K., Kumar CG., Balan SS. (2016) Antimicrobial activities of a promising glycolipid biosurfactant from a novel marine *Staphylococcus saprophyticus* SBPS15. *3Biotech* 6:163.
- Marchant R., Banat IM. (2010) The genus *Geobacillus* and hydrocarbon utilization. In: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Springer-Verlag, pp. 1887-1896.

- Marchant R., Banat IM. (2012) Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends Biotechnol* 11:558-565.
- Márquez SL., Blamey J.M. (2019) Isolation and partial characterization of a new moderate thermophilic *Albidovulum* sp. SLM16 with transaminase activity from Deception Island, Antarctica. *Biol Res* 52:5.
- Mendez C., Brana AF., Manzanal MB., Hardisson C. (1985) Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Can J Microbiol* 31:446-450.
- Meyer F., Paarmann D., D'souza M., Olson R., Glass EM., Kubal M., Paczian T., Rodriguez A., Stevens R., Wilke A., Wilkening J., Edwards RA. (2008) The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* 9:386.
- Morikawa M., Hirata Y., Imanaka T. (2000) A study on the structure-function relationship of the lipopeptide biosurfactant. *Biochim Biophys Acta* 1488:211-218.
- Mouafi FE., Mostafa M., Abo E., Moharamn ME. (2016) Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. *Biotechnol Rep* 9: 31-37.
- Mulligan, C.N., Cooper, D.G., Neufeld, R.J. (1984) Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. *Journal of Fermentation Technology* 62:311-314.
- Muñoz PA., Flores PA., Boehmwald FA., Blamey JM. (2011) Thermophilic bacteria present in a sample from Fumarole Bay, Deception Island. *Antarct Sci* 23:549-555.
- Muñoz P., Correa-Llantén D., Blamey J. (2013) Production, purification and partial characterization of four lipases from a thermophile isolated from Deception Island. *Lipids* 48:527-533.
- Muñoz, P., Correa-Llantén, D., Blamey, J. (2015) Ionic Liquids increase the catalytic efficiency of a lipase (Lip1) From an Antarctic Thermophilic Bacterium. *Lipids* 50:49-55.
- Nautiyal, C.S. (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170:265-270.
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z., Cameotra, S.S. (2011) Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International Journal of Molecular Sciences* 12:633-654.
- Pakpitcharoena A., Potivejkulb K., Kanjanayasa P., Areekita S., Chansiria K. (2008) Biodiversity of thermotolerant *Bacillus* sp. producing biosurfactants, biocatalysts, and antimicrobial agents. *ScienceAsia* 34:424-431.
- Perfumo A., Banat IM., Marchant R. (2018) Going Green and Cold: Biosurfactants from Low Temperature Environments to Biotechnology Applications. *Trends in biotechnology* 36:277-289.
- Pericard P., Dufresne Y., Couderc L., Blanquart S., Touzet H. (2018) MATAM: reconstruction of phylogenetic marker genes from short sequencing reads in metagenomes. *Bioinformatics* 34:585-591.

- Prakash O., Shouche Y., Jangid K., Kostka J.E. (2013) Microbial cultivation and the role of microbial resource centers in the omics era. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:51-62.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner FO. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41:590-596.
- Rampelotto PH. (2016) *Biotechnology of extremophiles: Advances and challenges (Grand Challenges in Biology and Biotechnology)*. New York, NY, Springer, pp. 720.
- Reddy MS., Naresh B., Leela T., Prashanthi M., Madhusudhan NC., Dhanasri G., Devi P. (2010) Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Brevibacillus* sp. *Bioresour Technol* 101:7980-3.
- Richardson AE., Simpson R.J. (2011) Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus. *Plant Physiol* 156:989-996.
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quinc, C., Mahé F. (2016) VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4:e2584.
- Satyanarayana T., Littlechild J., Kawarabayasi Y. (2013) Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology: *Biotechnology of thermophiles*. New York, NY, Springer, pp 954.
- Sobrinho HB., Luna JM., Rufino RD., Porto ALF, Sarubbo LA. (2013) Biosurfactants: classification properties and environmental applications. In: Govil N (ed) *Recent Developments in Biotechnology*, Studium Press LLC, Houston, pp 1-29.
- Straub, C.T., Zeldes, B.M., Schut, G.J., Adams, M.W.W., Kelly, R.M. (2017) Extremely thermophilic energy metabolisms: Biotechnological prospects. *Curr Opin Biotechnol* 45:104-112.
- Tyson GW., Chapman J., Hugenholtz P., Allen EE., Ram RJ., Richardson PM., et al. (2004) Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428:37-43.
- Wilkins LGE., Ettinger CL., Jospin G., Eisen, JA. (2019) Metagenome-assembled genomes provide new insight into the microbial diversity of two thermal pools in Kamchatka, Russia. *Scientific Reports* 9:3059.
- Woodcroft BJ., Singleton CM., Boyd JA., Evans PN., Emerson JB., et al. (2018) Genome-centric view of carbon processing in thawing permafrost. *Nature* 560:49-54.
- Xia W., Dong H., Zheng C., Cui Q., He P., Tang Y. (2015) Hydrocarbon degradation by a newly isolated thermophilic *Anoxybacillus* sp. with bioemulsifier production and new *alkB* genes. *RSC Adv* 5:1039.
- Xia W., Dong H., Yu Li., Bi Y., Yu W. (2016) Analysis of Biosurfactant Production by a New Thermophilic and Halotolerant Bacterium, *Geobacillus* sp. QT. *International Journal of Green Technology* 2:20-28.
- Youssef NH., Duncan KE., Nagle DP., Savage KN., Knapp RM., McInerney MJ. (2004) Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J Microbiol Methods* 56:339-47.

Zaikova E., Goerlitz DS., Tighe SW., Wagnern Y., Ba Y., Hall BL., Bevilacqua JG., Weng MM., Samuels-Fair MD., Johnson SS. (2019) Antarctic Relic Microbial Mat Community Revealed by Metagenomics and metatranscriptomics. *Frontiers in Ecology and Evolution* 7:1-22.

Zobell C. (1941) Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *J Mar Res* 4:42-75.

FIGURES

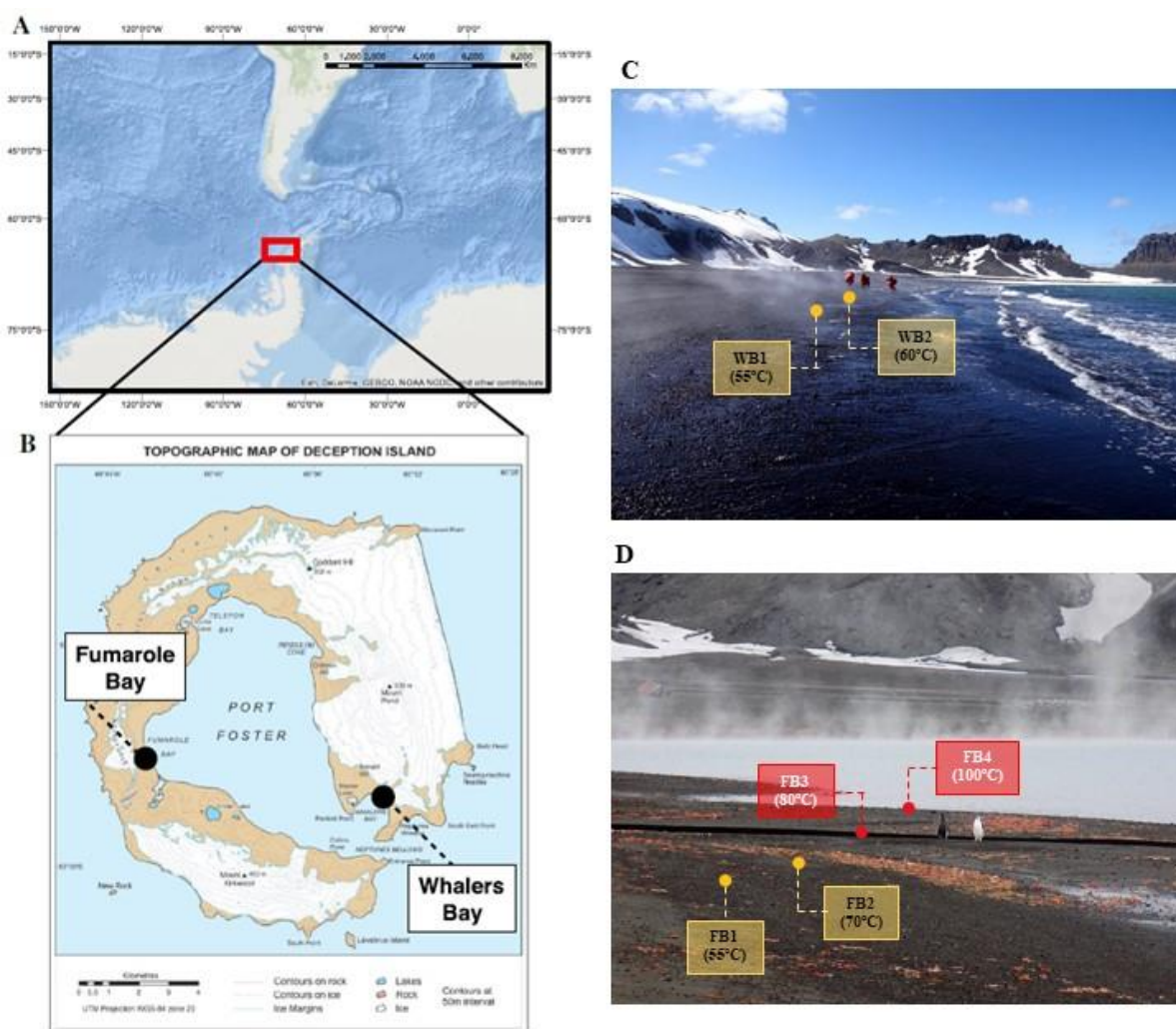


Fig. 1. Sampling map, adapted from Bendia et al. (2018a). Location of Antarctic Peninsula (a) and Deception Island, with Fumarole Bay and Whalers Bay geothermal sites highlighted (b). Distribution of collected samples across environmental gradients at studied geothermal sites, in (c) Whalers Bay and (d) for Fumarole Bay. Values of in situ temperatures are represented in yellow (fumaroles until 70°C) and red (fumaroles over 80°C).

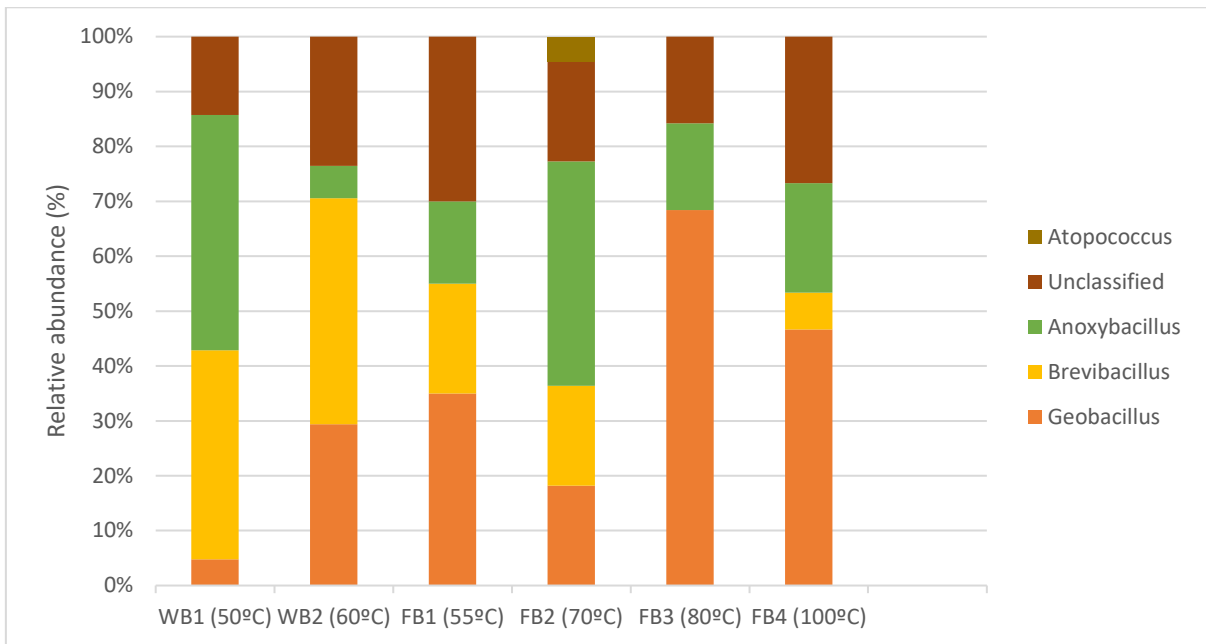


Fig. 2. Relative abundances of the taxonomic groups assigned to the isolates grown at 55°C at the maximum classification level. Environmental temperatures of each sampling site are represented. Sequences were assigned with 97% similarity against the SILVA database v. 132.

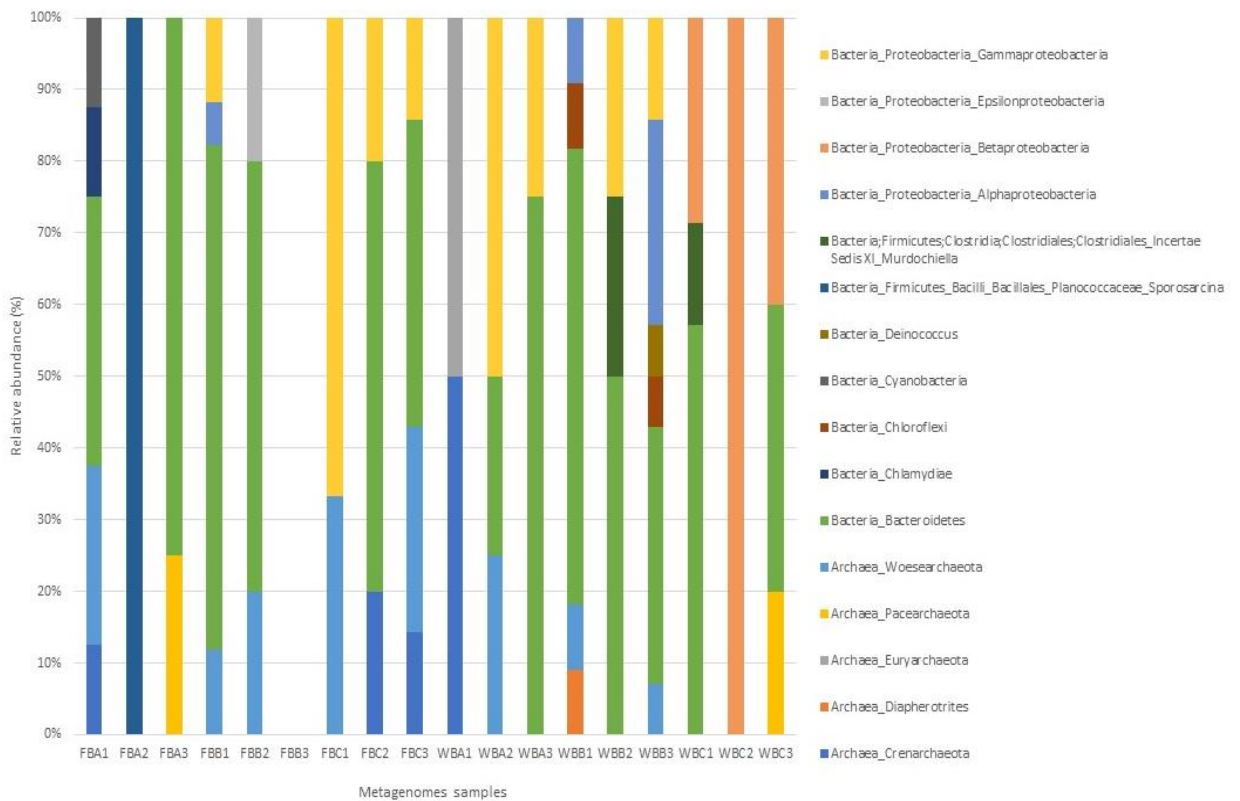


Fig. 3. Relative abundances of the taxonomic groups assigned to the SSU rRNA, reconstructed from metagenomes.

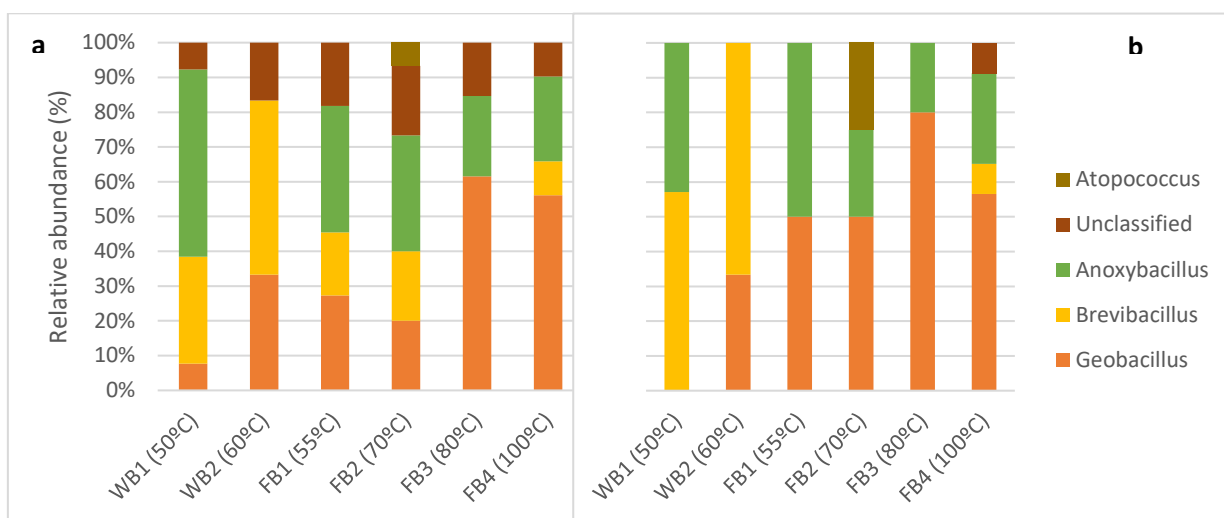


Fig. 4. Relative abundances of taxonomic groups to which the isolates grown at 55°C belong. Shown is the maximum classification level, capable of oil degrading (a) and biosurfactant producing (b). Environmental temperatures of each sampling site are represented. Sequences were assigned with 97% similarity against the SILVA database v. 132.

TABLES

Tab 1. List of thermophiles from Deception Island, Antarctica, capable of degrading crude oil and use as a carbon source, and their molecular identification.

Isolate code	Growth in crude oil	Oil drop test (triplicate)	SILVA v. 132 classification
FB1_1	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB1_2	Yes	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB1_3	Yes	++ / + / ++	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB1_6	No	n.t.	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB1_7	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB1_8	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB1_12	Yes	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB1_13	Yes	+ / + / ++	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB1_14	Yes	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus

FB1_16	Yes	- / - / -	Unclassified
FB1_17	No	n.t.	Unclassified
FB2_23	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB2_25	Yes	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB2_26	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB2_27	Yes	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB2_29	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB2_31	Yes	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB2_32	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB2_33	No	n.t.	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB2_35	Yes	+ / - / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB2_36	Yes	++ / + / ++	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB2_37	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB2_38	Yes	+++ / ++ / ++	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Carnobacteriaceae; Atopococcus
FB2_39	No	n.t.	Unclassified
FB2_40	No	n.t.	Unclassified
FB2_41	Yes	+ / - / -	Unclassified
FB3_43	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB3_44	Yes	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB3_45	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB3_47	Yes	++ / ++ / +++	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB3_48	No	n.t.	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB3_49	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB3_50	Yes	++ / ++ / +++	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB3_51	No	n.t.	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB3_54	Yes	+++ / - / +++	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB3_55	No	n.t.	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB3_58	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB3_59	No	n.t.	Unclassified
FB3_61	No	n.t.	Unclassified
FB4_62	No	n.t.	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus

FB4_65	No	n.t.	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_66	Yes	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_67	Yes	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_68	Yes	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_69	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_70	Yes	+ / - / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_71	Yes	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_72	Yes	+ / - / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_73	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_74	Yes	- / - / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB4_75	Yes	+ / - / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB4_76	Yes	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB4_77	Yes	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB4_79	Yes	+++ / +++ / +++	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_80	Yes	+ / - / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_81	No	n.t.	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_82	No	n.t.	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_84	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_85	Yes	+++ / +++ / +++	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_86	Yes	- / - / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_87	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_88	Yes	+++ / +++ / +++	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_89	Yes	- / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_90	Yes	- / - / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_91	Yes	- / +++ / +++	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_93	Yes	++ / ++ / +++	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_94	Yes	++ / + / ++	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_95	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus

FB4_96	Yes	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_99	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_100	Yes	+ / - / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_101	Yes	+ / - / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_102	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_103	Yes	+ / + / ++	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_104	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_105	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_115	Yes	- / - / -	Unclassified
FB4_116	Yes	+ / + / +	Unclassified
FB4_117	No	n.t.	Unclassified
FB4_119	Yes	- / - / -	Unclassified
WB1_122	Yes	++ / ++ / +++	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
WB1_123	Yes	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
WB1_124	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
WB1_125	Yes	++ / + / ++	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
WB1_126	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
WB1_127	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
WB1_128	Yes	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
WB1_133	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB1_134	Yes	+ / - / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB1_135	Yes	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB1_136	Yes	+ / + / ++	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB1_137	Yes	+ / - / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB1_138	No	n.t.	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
WB1_140	No	n.t.	Unclassified
WB2_144	Yes	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB2_145	Yes	+ / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB2_150	Yes	+ / - / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB2_152	No	n.t.	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus

WB2_153	Yes	+ / + / ++	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
WB2_159	No	n.t.	Unclassified

n.t. = not tested.

Strains in bold are those selected for biosurfactant production screening.

Tab 2. Strains isolated from different geothermal sites in Deception Island, their capacity to produce biosurfactant using different methodologies for screening (all in triplicate) and their molecular identification.

Isolate code	E24 – Crude oil EI (%)	E24 – Diesel EI (%)	E24 – Crude oil EI (%) – 100°C	E24 – Diesel EI (%) – 100°C	Drop-collapse test	Oil spreading assay	Hemolysis test	SILVA v. 132 classification
FB1_1	35	15	11	15	- / - / -	+ / + / +	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB1_3	--	--	n.t.	n.t.	- / - / -	- / - / -	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB1_12	--	--	n.t.	n.t.	- / - / -	- / - / -	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB1_13	--	--	n.t.	n.t.	- / - / -	- / - / -	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB1_14	35	4	35	12	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB2_25	30	5	20	15	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB2_26	--	10	n.t.	n.t.	- / - / -	+ / + / +	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB2_27	--	--	n.t.	n.t.	- / - / -	+ / + / +	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB2_31	--	--	n.t.	n.t.	- / - / -	+ / + / +	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB2_35	30	6	20	30	+ / + / +	+ / + / +	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB2_36	50	12	25	20	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB2_38	50	40	50	40	+ / + / +	+ / + / +	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Carnobacteriaceae; Atopococcus
FB3_44	20	--	n.t.	n.t.	+ / + / +	+ / + / +	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB3_47	--	--	n.t.	n.t.	- / - / -	- / - / -	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB3_49	50	30	50	30	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus

FB3_50	--	--	n.t.	n.t.	- / - / -	- / - / -	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB3_54	50	4	50	6	- / - / -	+ / + / +	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_66	45	10	45	15	- / - / -	+ / + / +	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_67	50	4	50	10	- / - / -	+ / + / +	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_68	50	8	45	10	- / - / -	+ / + / +	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_69	35	11	30	15	- / - / -	- / - / -	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_70	--	--	n.t.	n.t.	- / - / -	- / - / -	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_71	--	--	n.t.	n.t.	- / - / -	- / - / -	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_75	--	10	n.t.	n.t.	- / - / -	- / - / -	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB4_77	40	25	40	25	+ / + / +	+ / + / +	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB4_79	--	--	n.t.	n.t.	- / - / -	- / - / -	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_80	--	--	n.t.	n.t.	- / - / -	- / - / -	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_85	35	20	40	20	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_88	50	40	50	40	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_89	35	56	100	60	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_91	50	35	50	35	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_93	40	8	50	14	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_94	--	--	n.t.	n.t.	- / - / -	- / - / -	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus

FB4_95	--	--	n.t.	n.t.	- / - / -	- / - / -	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_100	15	--	n.t.	n.t.	+ / + / +	+ / + / +	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_101	50	20	50	20	- / - / -	+ / + / +	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_103	10	--	n.t.	n.t.	+ / + / +	+ / + / +	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_105	55	8	100	10	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_116	20	--	n.t.	n.t.	+ / + / +	+ / + / +	- / - / -	Unclassified
FB4_119	40	40	40	40	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	Unclassified
WB1_122	60	6	55	8	- / - / -	+ / + / +	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
WB1_125	--	--	n.t.	n.t.	+ / + / +	+ / + / +	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
WB1_128	40	8	40	23	- / - / -	+ / + / +	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
WB1_134	--	10	n.t.	n.t.	- / - / -	- / - / -	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB1_135	--	--	n.t.	n.t.	- / - / -	- / - / -	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB1_136	10	5	n.t.	n.t.	- / - / -	- / - / -	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB1_137	--	--	n.t.	n.t.	- / - / -	- / - / -	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB2_145	10	6	n.t.	n.t.	- / - / -	- / - / -	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB2_150	--	--	n.t.	n.t.	- / - / -	- / - / -	- / - / -	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB2_153	55	30	60	30	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus

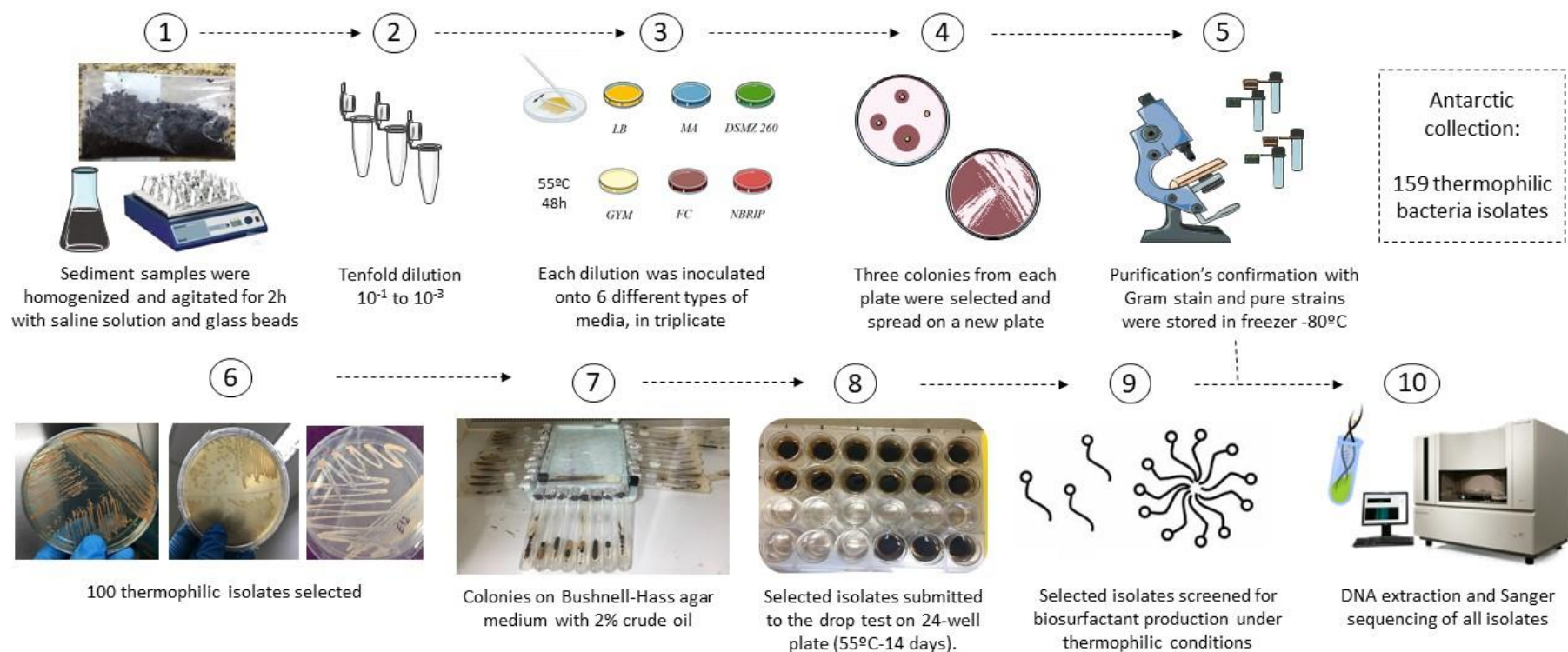
-- = negative result for emulsification.

n.t. = not tested (EI = < 30%).

Strains in bold are those with the better results in the screening for biosurfactant production (EI ≥ 50% for one petroleum hydrocarbon source).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Figure 1. Scheme representing cultivation steps (for description, see text).



Supplementary Table 1. List of Deception thermophiles isolated from two geothermal sites, which were identified through 16S rRNA gene sequencing, including the environmental temperature of the sample (Celsius), percentage of sequence identity with database and their assigned taxonomy using SILVA v. 132 database.

Isolate code	Local	Environmental temperature (°C)	Identity (%)	SILVA v. 132 classification
FB1_1	Fumarole Bay	55°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB1_2	Fumarole Bay	55°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB1_3	Fumarole Bay	55°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB1_4	Fumarole Bay	55°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB1_5	Fumarole Bay	55°C	98	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB1_6	Fumarole Bay	55°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB1_7	Fumarole Bay	55°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB1_8	Fumarole Bay	55°C	88	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB1_9	Fumarole Bay	55°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB1_10	Fumarole Bay	55°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB1_11	Fumarole Bay	55°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB1_12	Fumarole Bay	55°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB1_13	Fumarole Bay	55°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB1_14	Fumarole Bay	55°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB1_15	Fumarole Bay	55°C	80	Unclassified
FB1_16	Fumarole Bay	55°C	55	Unclassified
FB1_17	Fumarole Bay	55°C	61	Unclassified
FB1_18	Fumarole Bay	55°C	74	Unclassified
FB1_19	Fumarole Bay	55°C	40	Unclassified
FB1_20	Fumarole Bay	55°C	59	Unclassified
FB2_21	Fumarole Bay	70°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB2_22	Fumarole Bay	70°C	98	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB2_23	Fumarole Bay	70°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB2_24	Fumarole Bay	70°C	93	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus

FB2_25	Fumarole Bay	70°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB2_26	Fumarole Bay	70°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB2_27	Fumarole Bay	70°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB2_28	Fumarole Bay	70°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB2_29	Fumarole Bay	70°C	100	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB2_30	Fumarole Bay	70°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB2_31	Fumarole Bay	70°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB2_32	Fumarole Bay	70°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB2_33	Fumarole Bay	70°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB2_34	Fumarole Bay	70°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB2_35	Fumarole Bay	70°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB2_36	Fumarole Bay	70°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB2_37	Fumarole Bay	70°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB2_38	Fumarole Bay	70°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Carnobacteriaceae; Atopococcus
FB2_39	Fumarole Bay	70°C	82	Unclassified
FB2_40	Fumarole Bay	70°C	73	Unclassified
FB2_41	Fumarole Bay	70°C	46	Unclassified
FB2_42	Fumarole Bay	70°C	57	Unclassified
FB3_43	Fumarole Bay	80°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB3_44	Fumarole Bay	80°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB3_45	Fumarole Bay	80°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB3_46	Fumarole Bay	80°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB3_47	Fumarole Bay	80°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB3_48	Fumarole Bay	80°C	100	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB3_49	Fumarole Bay	80°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB3_50	Fumarole Bay	80°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB3_51	Fumarole Bay	80°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus

FB3_52	Fumarole Bay	80°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB3_53	Fumarole Bay	80°C	96	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB3_54	Fumarole Bay	80°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB3_55	Fumarole Bay	80°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB3_56	Fumarole Bay	80°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB3_57	Fumarole Bay	80°C	100	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB3_58	Fumarole Bay	80°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB3_59	Fumarole Bay	80°C	58	Unclassified
FB3_60	Fumarole Bay	80°C	60	Unclassified
FB3_61	Fumarole Bay	80°C	66	Unclassified
FB4_62	Fumarole Bay	100°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_63	Fumarole Bay	100°C	100	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_64	Fumarole Bay	100°C	98	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_65	Fumarole Bay	100°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_66	Fumarole Bay	100°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_67	Fumarole Bay	100°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_68	Fumarole Bay	100°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_69	Fumarole Bay	100°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_70	Fumarole Bay	100°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_71	Fumarole Bay	100°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_72	Fumarole Bay	100°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_73	Fumarole Bay	100°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
FB4_74	Fumarole Bay	100°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB4_75	Fumarole Bay	100°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB4_76	Fumarole Bay	100°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB4_77	Fumarole Bay	100°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
FB4_78	Fumarole Bay	100°C	98	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus

FB4_105	Fumarole Bay	100°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
FB4_106	Fumarole Bay	100°C	60	Unclassified
FB4_107	Fumarole Bay	100°C	50	Unclassified
FB4_108	Fumarole Bay	100°C	72	Unclassified
FB4_109	Fumarole Bay	100°C	60	Unclassified
FB4_110	Fumarole Bay	100°C	56	Unclassified
FB4_111	Fumarole Bay	100°C	82	Unclassified
FB4_112	Fumarole Bay	100°C	55	Unclassified
FB4_113	Fumarole Bay	100°C	59	Unclassified
FB4_114	Fumarole Bay	100°C	64	Unclassified
FB4_115	Fumarole Bay	100°C	78	Unclassified
FB4_116	Fumarole Bay	100°C	59	Unclassified
FB4_117	Fumarole Bay	100°C	44	Unclassified
FB4_118	Fumarole Bay	100°C	79	Unclassified
FB4_119	Fumarole Bay	100°C	51	Unclassified
FB4_120	Fumarole Bay	100°C	70	Unclassified
FB4_121	Fumarole Bay	100°C	51	Unclassified
WB1_122	Whalers Bay	50°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
WB1_123	Whalers Bay	50°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
WB1_124	Whalers Bay	50°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
WB1_125	Whalers Bay	50°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
WB1_126	Whalers Bay	50°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
WB1_127	Whalers Bay	50°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
WB1_128	Whalers Bay	50°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
WB1_129	Whalers Bay	50°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
WB1_130	Whalers Bay	50°C	91	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB1_131	Whalers Bay	50°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB1_132	Whalers Bay	50°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB1_133	Whalers Bay	50°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB1_134	Whalers Bay	50°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB1_135	Whalers Bay	50°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB1_136	Whalers Bay	50°C	88	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus

WB1_137	Whalers Bay	50°C	92	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB1_138	Whalers Bay	50°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
WB1_139	Whalers Bay	50°C	61	Unclassified
WB1_140	Whalers Bay	50°C	73	Unclassified
WB1_141	Whalers Bay	50°C	44	Unclassified
WB2_142	Whalers Bay	60°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
WB2_143	Whalers Bay	60°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Anoxybacillus
WB2_144	Whalers Bay	60°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB2_145	Whalers Bay	60°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB2_146	Whalers Bay	60°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB2_147	Whalers Bay	60°C	95	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB2_148	Whalers Bay	60°C	95	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB2_149	Whalers Bay	60°C	95	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB2_150	Whalers Bay	60°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Brevibacillus
WB2_151	Whalers Bay	60°C	95	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
WB2_152	Whalers Bay	60°C	98	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
WB2_153	Whalers Bay	60°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
WB2_154	Whalers Bay	60°C	99	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
WB2_155	Whalers Bay	60°C	100	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
WB2_156	Whalers Bay	60°C	63	Unclassified
WB2_157	Whalers Bay	60°C	74	Unclassified
WB2_158	Whalers Bay	60°C	74	Unclassified
WB2_159	Whalers Bay	60°C	69	Unclassified

5.4 CAPÍTULO III

DRAFT-GENOME SEQUENCE OF *GEOBACILLUS* SP. STRAIN LEMMJ02, A THERMOPHILE ISOLATED FROM AN ANTARCTIC VOLCANO

Running Head: Draft-genome of an Antarctic thermophilic *Geobacillus* sp.

Júnia Schultz^a, René Kallies^b, Ulisses Nunes da Rocha^b, Alexandre Soares Rosado^{a#}

^a Laboratory of Molecular Microbial Ecology, Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

^b Department of Environmental Microbiology, Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, Leipzig, Germany.

#Address correspondence to Alexandre Soares Rosado, asrosado@micro.ufrj.br

The thermophilic *Geobacillus* sp. strain LEMMJ02 was isolated from Fumarole Bay's sediment, in Deception Island, an active Antarctic volcano. Here, we report its draft-genome, which consists of 3,160,938 bp with 52.8% G+C content and 3,523 protein-coding genes.

The genus *Geobacillus* is a member of the phylum Firmicutes, consisting of Gram-positive, aerobic or facultative anaerobic, heterotrophic and obligatory thermophilic bacteria (1). It was identified from different thermophilic habitats, such as hot springs, volcanoes and man-made thermophilic biotopes (2, 3). The *Geobacillus* species can have biotechnological importance, mainly bioremediation, second-generation biofuel and enzymes production (4, 5).

Here, we present the draft-genome sequence of *Geobacillus* sp. strain LEMMJ02, isolated from Antarctic volcano sediment collected near to a fumarole vent (500 g of sediment from 0-5 cm deep and environmental temperature of 100°C) in Fumarole Bay, Deception Island (62°58'02,7"S; 60°42'36,4"W). Sediment sample was homogenized and 10 g was added to 90 mL of saline solution (0.85%) with glass beads

and agitated for 2 h. Serial tenfold dilutions (from 10^{-1} to 10^{-3}) were prepared in the same diluent and 0.1 mL of each dilution was spread over Glucose Yeast Malt medium plates.

After incubation at 55°C for 48 h, a single colony was used to extract the genomic DNA using Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA) and posteriorly, quantified using Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The NEBNext Ultra II FS DNA library kit (New England Biolabs, Ipswich, USA) was used to prepare a paired-end 300 bases library, which was sequenced on an Illumina MiSeq system. Sequences were quality-checked and trimmed with Sickle (Phred quality score of >30) (6) and assembled with SPAdes (7). Assembled scaffolds were quality-checked with CheckM and RefineM (8), and the coding DNA sequences (CDSs) were predicted and annotated using NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) (9) and Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) server (10). Default settings were used for all software.

The assembly of *Geobacillus* sp. LEMMJ02 resulted in 433 contigs with a total length of 3,436,274 bp and a coverage of 36X. The completeness, obtained by CheckM and RefineM, was 98.91%, 0.0% of contamination, and 52.8% GC content. In total, it was predicted, by PGAP, 3,799 genes, among those 3,523 protein-coding genes, 84 tRNA genes, 29 rRNA genes, 5 noncoding RNA genes, 158 pseudogenes and also, 3 CRISPR arrays were predicted. The annotation results from RAST revealed genes coding for terpenoids biosynthesis and aromatic degradation of fluorene, naphthalene and anthracene were predicted from the genome using RAST. Genes related to the production of secondary metabolites were detected with anti-SMASH (11), highlighting the presence of fengycin – an antifungal lipopeptide, as well as bacteriocin and terpene. The presence of resistance genes was verified by ResFinder 2.1 (12) and no match for resistance genes was found.

Data availability. This Whole Genome Shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession VKJO00000000 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/VKJO00000000>). Raw data are available in the NCBI Sequence Read Archive with the accession number SRR10040620, which is part of BioProject number PRJNA554144.

ACKNOWLEDGMENTS

This work received scientific and financial support from the National Council for Research and Development (CNPq), National Council for the Improvement of Higher Education (CAPES) and Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ. We also thank Yuri Pinheiro for collecting samples in Deception Island and the Brazilian Antarctic Program for logistical support during the Antarctica Operation. We are grateful to Nicole Steinbach for excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Nazina TN, Tourova TP, Poltarau AB. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus thermoglucosidasius* and *Geobacillus thermodenitrificans*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51: 433–446.
2. Zeigler DR. 2014. The *Geobacillus paradox*: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet? *Microbiology*, 160, 1–11.
3. Burgess SA, Flint SH, Lindsay D, Cox MP, Biggs PJ. 2017. Insights into *the Geobacillus stearothermophilus* species based on phylogenomic principles. *BMC Microbiol*, 17 (1): 140.
4. Cripps RE, Eley K, Leak DJ, Rudd B, Taylor M, Todd M, et al. 2009. Metabolic engineering of *Geobacillus thermoglucosidasius* for high yield ethanol production. *Metabolic Engineering*, 11, 398e408.
5. Banat IM, Marchant R. *Geobacillus* activities in soil and oil contamination remediation. In: Logan NA, De Vos P, editors. *Endospore-Forming Soil Bacteria*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. p. 259–280.
6. Joshi NA, Fass JN. 2011. Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33) [Software]. Available at <https://github.com/najoshi/sickle>.
7. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*, 19 (5): 455–477.

8. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. 2015. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res*, 25 (7): 1043–1055.
9. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9:75.
10. Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M, Ostell J. 2016. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res*, 44 (14): 6614–6624.
11. Medema MH, Blin K, Cimermancic P, de Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, Weber T, Takano E, Breitling R. 2011. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res*, 39(Web Server issue):W339–W346.
12. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 67: 2640–2644.

DRAFT-GENOME SEQUENCE OF *BREVIBACILLUS* SP. STRAIN LEMMJ03 ISOLATED FROM AN ANTARCTIC VOLCANO SEDIMENT

Running Head: Draft-genome of a thermophilic *Brevibacillus* sp.

Júnia Schultz^a, René Kallies^b, Ulisses Nunes da Rocha^b, Alexandre Soares Rosado^{a#}

^a Laboratory of Molecular Microbial Ecology, Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

^b Department of Environmental Microbiology, Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, Leipzig, Germany.

#Address correspondence to Alexandre Soares Rosado, asrosado@micro.ufrj.br

Here, we announce the draft-genome sequence of *Brevibacillus* sp. LEMMJ03, isolated from Whalers Bay's sediment, Deception Island, Antarctica. In total, 4,500 CDS, among those 102 coding for tRNAs and 5 for ncRNAs, were predicted from the 4.64 Mb genome. Functions were predicted for bacteriocin and degradation of aromatic compounds.

Members of the genus *Brevibacillus* (phylum Firmicutes) are rod-shaped Gram-positive, spore-forming, mostly strict aerobes with ubiquitous distribution in soils, including Antarctica (1, 2).

Geothermal habitats in Antarctica typically consist of heated mineral soils found near fumarolic vents and are exclusively associated with geologically active volcanoes, such as Deception Island; a marine polar volcano with temperatures ranging from 0 to 120°C and gradients of salinity and geochemistry (2, 3). These unique characteristics make the thermophiles of Antarctica an untapped resource for bioprospecting new enzymes, cosmetic products and other biotechnological applications (4, 5).

Brevibacillus sp. strain LEMMJ03 was isolated from a thermophilic sediment (50°C) collected near to a fumarole vent in Whalers Bay (62°58'788"S; 60°33'464"W), Deception Island. Briefly, the sediment (500 g) was collected (0-5 cm depth), placed in

sterile plastic bag and stored at 4°C. For bacterial isolation, the sample was homogenized, and 10 g was added to 90 ml of saline (0.85% NaCl) in a flask with glass beads and kept stirring at 2xg for 2 h. Serial tenfold dilutions were prepared, where 0.1 mL of each dilution was spread over *Bacillus schlegelii* heterotrophic medium (DSMZ 260) plates and incubated at 55°C for 48 h.

Single colony was isolated, and the genomic DNA extraction was performed using a Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA) and quantified using Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). For the genome sequencing on an Illumina MiSeq platform, a NEBNext Ultra II FS DNA library kit (New England Biolabs, Ipswich, USA) was used to prepare a paired-end 301-bp library, following manufacturer's instructions. Sickle (6), with a Phred quality score of >30, was used for the quality control and to trim the sequences. De novo assembled was performed using SPAdes (7) and used CheckM and RefineM (8) for the quality checked and to provide completeness and contamination information. Annotation was carried out with the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) (9) and on the Rapid Annotation using Subsystems Technology (RAST) server (10). Default parameters were used for all software.

The draft assembly of *Brevibacillus* sp. LEMMJ03 resulted in a length of 4,646,831 bp with 53X coverage, 98.66% completeness and 1.51% of contamination, 142 contigs and a GC content of 58.7%. Annotation by PGAP predicted, in total, 102 tRNA genes, 5 noncoding RNA genes, 34 rRNA genes and 4,500 CDS. The annotation by RAST identified 29 genes for metabolism of central aromatic intermediates and peripheral pathways for catabolism of aromatic compound, such as for naphthalene, anthracene, toluene and xylene degradation. No resistance genes were identified by ResFinder 2.1. (11). In addition, genes coding for potential production of bacteriocin and ectoine were detected with anti-SMASH (12), highlighting the biotechnological interest on this strain LEMMJ03 for bioremediation of contaminated environments with hydrocarbons and new antimicrobial products.

Data availability. This Whole Genome Shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession VKJN00000000 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/VKJN00000000). The version described in this paper is VKJN01000000. Raw data are available in the NCBI Sequence Read Archive

with the accession number SRR10040619, which is part of BioProject number PRJNA554144.

ACKNOWLEDGMENTS

This work receives support from the National Council for Research and Development (CNPq), National Council for the Improvement of Higher Education (CAPES) and Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ. We also thank Yuri Pinheiro and Nicole Steinbach for excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Logan NA, Berge O, Bishop AH, Busse HJ, De Vos P, Fritze D, Heyndrickx M, Kämpfer P, Rabinovitch L, Salkinoja-Salonen MS, Seldin L, Ventosa A. 2009. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59 (8), 2114–2121.
2. Bendia AG, Araujo GG, Pulschen AA, Contro B, Duarte RTD, Rodrigues F, Galante D, Pellizari VH. 2018. Surviving in hot and cold: psychrophiles and thermophiles from Deception Island volcano, Antarctica. *Extremophiles*, 22 (6): 917–929.
3. Herbold CW, McDonald I, Cary C. Microbial ecology of geothermal habitats in Antarctica. In: Cowan, d. (ed.). *Antarctic terrestrial microbiology*. New York, springer, 2014. p. 181-215.
4. Amenábar MJ, Flores PA, Pugin B, Boehmwald FA, Blamey JM. 2013. Archaeal diversity from hydrothermal systems of Deception Island, Antarctica. *Polar Biology*, 36 (3), 373–380.
5. Mehta R, Singhal P, Singh H, Damle D, Sharma AK. 2016. Insight into thermophiles and their wide-spectrum applications. *3 Biotech*, 6 (1), 81.
6. Joshi NA, Fass JN. 2011. Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33) [Software]. Available at <https://github.com/najoshi/sickle>.
7. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*, 19 (5): 455–477.

8. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. 2015. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res*, 25 (7): 1043–1055.
9. Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M, Ostell J. 2016. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res*, 44 (14): 6614–6624.
10. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9:75.
11. Medema MH, Blin K, Cimermancic P, de Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, Weber T, Takano E, Breitling R. 2011. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res*, 39(Web Server issue):W339–W346.
12. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 67: 2640–2644.

5.4 CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO DA ANÁLISE METAGENÔMICA

Conforme mencionado anteriormente, a metagenômica aplica um conjunto de tecnologias genômicas e ferramentas de bioinformática para acessar diretamente o conteúdo genético de todos os organismos presentes na amostra, não apenas aqueles que são mais propensos ao cultivo. Isso resulta em uma grande quantidade de informações, sendo necessário selecioná-las de acordo com o objetivo de cada trabalho. No presente estudo, o emprego da análise metagenômica foi utilizada com o intuito de avaliar a taxonomia e o potencial metabólico das comunidades microbianas de ambientes geotermiais da Ilha Deception, com ênfase na degradação de compostos aromáticos.

Para facilitar a discussão, os tópicos foram subdivididos em: resultados gerais do sequenciamento, classificação taxonômica por MG-RAST e montagem de genomas a partir dos metagenomas, e análise funcional dos metagenomas da Ilha Deception.

5.4.1 Resultados gerais do sequenciamento *Shotgun* da Ilha Deception

Para a obtenção dos dados metagenômicos foi utilizado o sequenciamento *Shotgun* do DNA total das amostras da Ilha Deception na plataforma Illumina HiSeq. As concentrações obtidas após extração de 10 g de cada amostra, purificação e concentração em 20X. Após a concentração do DNA, os valores apresentaram-se entre 0,034 e 21,6 ng/ μ L, em um volume total de 200 μ L. Este procedimento foi realizado por Bendia (2016), do grupo da Prof. Dra. Vivian H. Pellizari, do Instituto Oceanográfico da USP).

Esta baixa concentração de DNA obtida, mesmo após concentração, está dentro dos valores esperados, uma vez que as condições ambientais extremas dos sítios geotermiais limitam a permanência de grupos microbianos, onde apenas os adaptados a estas condições se desenvolvem.

De acordo com Bendia (2016), o esforço de sequenciamento em Illumina HiSeq gerou um total de 567.410.264 *reads*. Após a filtragem por qualidade, 475.895.996 *reads* foram selecionados para as anotações taxonômicas e funcionais. Os valores correspondentes ao número de *reads* obtidos por amostra e o número de *reads* após

os filtros de qualidade encontram-se na Figura 20. O número de *reads* brutos variou entre 12 milhões (FBA2) a 60 milhões (FBB1, FBB2, WBB2) por amostra, enquanto que para os *reads* filtrados, variou entre 10 milhões (FBA2) a 53 milhões (WBB2).

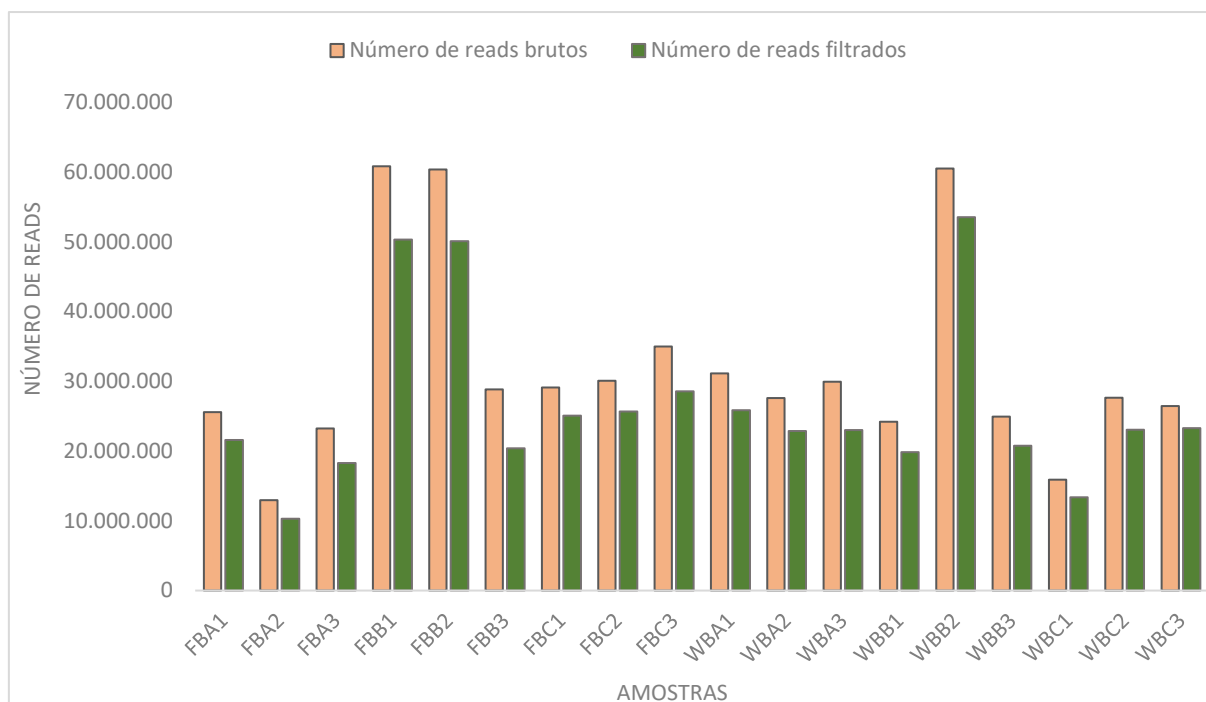


Figura 20. Resultados do sequenciamento do metagenoma *shotgun* pela plataforma Illumina HiSeq quanto ao número de *reads* totais obtidos e número de *reads* após os filtros de qualidade. Fonte: Autores.

5.4.2 Análise taxonômica dos metagenomas da Ilha Deception

A análise taxonômica dos metagenomas provenientes dos sedimentos da Ilha Deception foi realizada por duas maneiras: no servidor online MG-RAST e pela anotação taxonômica de genomas reconstruídos a partir dos metagenomas.

No MG-RAST, a taxonomia foi atribuída através das classificações dos genes funcionais com o melhor *hit* com o banco de dados do M5NR. Estes estão apresentados nas Figuras 21 e 22, ilustrando a classificação a nível de domínio e filo, respectivamente.

O domínio Bacteria prevaleceu em todas as amostras, com exceção de uma das triplicatas amostrais (FBA3). Esta triplicata apresentou também a presença de Archaea, o que condiz com o ambiente amostrado, uma vez que se refere à amostra

próximo à fumarola no sítio geotermal de Fumarole Bay, cuja temperatura ambiental obtida foi de 98°C.

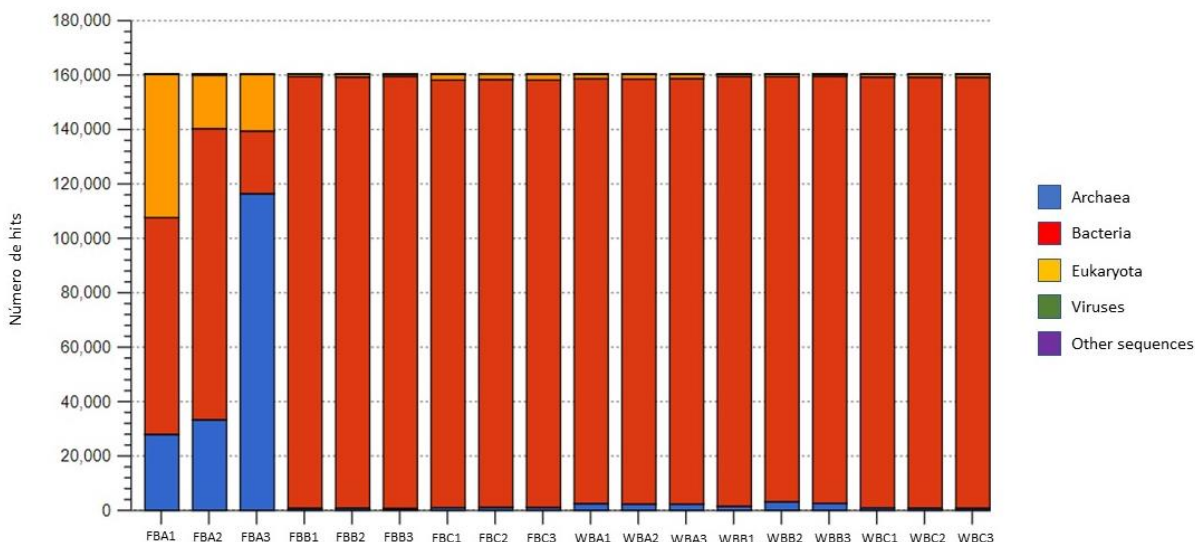


Figura 21. Número de *hits* para os Domínios detectados na classificação taxonômica com o banco de dados do M5NR, pelo MG-RAST. Fonte: Autores.

Foram selecionados para as análises seguintes apenas os *reads* que se classificaram como pertencentes ao domínio Bacteria. Na Figura 23, pode-se observar o *heatmap* gerado com os filis bacterianos anotados.

Houve a predominância dos Filos Proteobacteria e Bacteroidetes em todas as amostras, sendo o filo Bacteroidetes o que apresentou a maior abundância nas amostras FBB, FBC, WBA, WBB e WBC. Já na triplicata de Fumarole Bay com temperatura ambiental de 98°C (FBA), apresentou a elevada abundância do Filo Firmicutes. Os demais Filos apresentaram distribuição homogênea entre as amostras e baixa abundância.

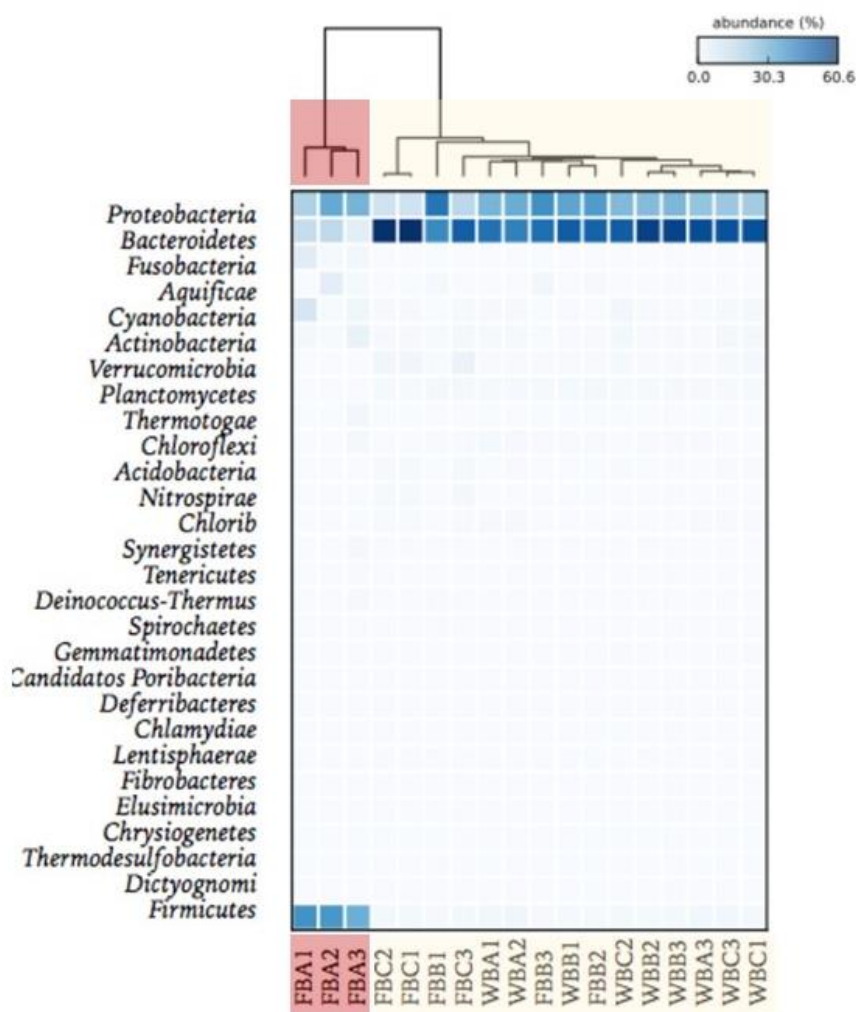


Figura 22. Filos bacterianos dos sedimentos da Ilha Deception classificados através banco de dados do M5NR, disponível no MG-RAST, exibidos em *Heatmap*. Fonte: Adaptado de Bendia (2016).

Quanto à reconstrução de genomas através dos metagenomas da Ilha Deception, foram recuperados ao total 43 genomas (MAGs). Na Tabela 3 pode ser observada a identificação dos MAGs e a taxonomia atribuída por *Genome Taxonomy Database* (GTDB), e na Figura 23, o número de genomas encontrados em cada Filo detectado.

Tabela 3. Identificação dos genomas reconstruídos a partir dos metagenomas (MAGs) da Ilha Deception, Antártica, por GTDB (*Genome Taxonomy Database*).

ID MAG	Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie
1	d__Archaea	p__Crenarchaeota	c__Nitrososphaeria	o__Nitrososphaerales	f__UBA213	g__	s__
2	d__Archaea	p__Crenarchaeota	c__Thermoprotei	o__Desulfurococcales	f__Acidilobaceae	g__	s__
3	d__Archaea	p__Crenarchaeota	c__Thermoprotei	o__Desulfurococcales	f__Pyrodictiaceae	g__	s__
4	d__Archaea	p__Nanoarchaeota	c__Woearchaeia	o__	f__	g__	s__
5	d__Bacteria	p__Aquificota	c__Aquificae	o__Hydrogenothermales	f__Hydrogenothermaceae	g__	s__
6	d__Bacteria	p__Bacteroidota	c__Bacteroidia	o__AKYH767	f__b-17BO	g__	s__
7	d__Bacteria	p__Bacteroidota	c__Bacteroidia	o__Chitinophagales	f__Chitinophagaceae	g__65-1	s__
8	d__Bacteria	p__Bacteroidota	c__Bacteroidia	o__Chitinophagales	f__Chitinophagaceae	g__Ferruginibacter	s__
9	d__Bacteria	p__Bacteroidota	c__Bacteroidia	o__Chitinophagales	f__Saprospiraceae	g__GCA-2698985	s__GCA_002698985.1
10	d__Bacteria	p__Bacteroidota	c__Bacteroidia	o__Chitinophagales	f__Saprospiraceae	g__	s__
11	d__Bacteria	p__Bacteroidota	c__Bacteroidia	o__Cytophagales	f__Cyclobacteriaceae	g__	s__
12	d__Bacteria	p__Bacteroidota	c__Bacteroidia	o__Cytophagales	f__Thermonemataceae	g__Thermonema	s__T. rossianum
13	d__Bacteria	p__Bacteroidota	c__Bacteroidia	o__Flavobacteriales	f__Crocinitomicaceae	g__	s__
14	d__Bacteria	p__Bacteroidota	c__Bacteroidia	o__Flavobacteriales	f__Flavobacteriaceae	g__Arenitalea	s__
15	d__Bacteria	p__Bacteroidota	c__Bacteroidia	o__Flavobacteriales	f__Flavobacteriaceae	g__Eudoraea	s__
16	d__Bacteria	p__Bacteroidota	c__Bacteroidia	o__Flavobacteriales	f__Flavobacteriaceae	g__Flaviramulus	s__
17	d__Bacteria	p__Bacteroidota	c__Bacteroidia	o__Flavobacteriales	f__Flavobacteriaceae	g__Flavobacterium	s__
18	d__Bacteria	p__Bacteroidota	c__Bacteroidia	o__Flavobacteriales	f__Flavobacteriaceae	g__GCA002733185	s__
19	d__Bacteria	p__Bacteroidota	c__Bacteroidia	o__Flavobacteriales	f__Flavobacteriaceae	g__GCA-2747695	s__
20	d__Bacteria	p__Bacteroidota	c__Bacteroidia	o__Flavobacteriales	f__Flavobacteriaceae	g__Gelidibacter	s__
21	d__Bacteria	p__Bacteroidota	c__Bacteroidia	o__Flavobacteriales	f__Flavobacteriaceae	g__HC6-5	s__
22	d__Bacteria	p__Bacteroidota	c__Bacteroidia	o__Flavobacteriales	f__Flavobacteriaceae	g__	s__
23	d__Bacteria	p__Bacteroidota	c__Bacteroidia	o__Flavobacteriales	f__Flavobacteriaceae	g__Ulvibacter	s__
24	d__Bacteria	p__Bacteroidota	c__Bacteroidia	o__Flavobacteriales	f__	g__	s__

25	d__Bacteria	p__Bacteroidota	c__Bacteroidia	o__Flavobacteriales	f__koll-22	g__	s__
26	d__Bacteria	p__Calditrichota	c__Calditrichia	o__RBG-13-44-9	f__	g__	s__
27	d__Bacteria	p__Campylobacterota	c__Campylobacteria	o__Campylobacterales	f__Thiovulaceae	g__Sulfurimonas	s__
28	d__Bacteria	p__Chloroflexota	c__Anaerolineae	o__Anaerolineales	f__envOPS12	g__	s__
29	d__Bacteria	p__Chloroflexota	c__Anaerolineae	o__Caldilineales	f__Caldilineaceae	g__	s__
30	d__Bacteria	p__Chloroflexota	c__Anaerolineae	o__Promineofilales	f__Promineofilaceae	g__GCA-2699125	s__
31	d__Bacteria	p__Firmicutes	c__Bacilli	o__Bacillales_A	f__Planococcaceae	g__Sporosarcina_C	s__
32	d__Bacteria	p__Patescibacteria	c__Paceibacteria	o__UBA9983	f__Nomurabacteraceae	g__UBA9973	s__
33	d__Bacteria	p__Proteobacteria	c__Alphaproteobacteria	o__Rhodobacterales	f__Rhodobacteraceae	g__Amylibacter	s__
34	d__Bacteria	p__Proteobacteria	c__Alphaproteobacteria	o__Rhodobacterales	f__Rhodobacteraceae	g__Roseovarius	s__
35	d__Bacteria	p__Proteobacteria	c__Alphaproteobacteria	o__Rhodobacterales	f__Rhodobacteraceae	g__Sulfitobacter	s__
36	d__Bacteria	p__Proteobacteria	c__Gammaproteobacteria	o__Betaproteobacteriales	f__Gallionellaceae	g__Gallionella	s__
37	d__Bacteria	p__Proteobacteria	c__Gammaproteobacteria	o__Enterobacterales	f__Alteromonadaceae	g__GCA-2401725	s__
38	d__Bacteria	p__Proteobacteria	c__Gammaproteobacteria	o__Enterobacterales	f__Alteromonadaceae	g__	s__
39	d__Bacteria	p__Proteobacteria	c__Gammaproteobacteria	o__Enterobacterales	f__GCA-002770795	g__	s__
40	d__Bacteria	p__Proteobacteria	c__Gammaproteobacteria	o__Enterobacterales	f__Kangiellaceae	g__	s__
41	d__Bacteria	p__Proteobacteria	c__Gammaproteobacteria	o__	f__	g__	s__
42	d__Bacteria	p__Proteobacteria	c__Gammaproteobacteria	o__Thiotrichales	f__Thiotrichaceae	g__	s__
43	d__Bacteria	p__Proteobacteria	c__Gammaproteobacteria	o__Xanthomonadales	f__Marinicellaceae	g__	s__

* ID MAG: Identificação do Genoma reconstruído a partir de metagenoma

Local: FB = Fumarole Bay; WB = Whalers Bay.

FBA1, 2, 3 = 98°C

FBB1, 2, 3 = 66-80°C

FBC1, 2, 3 = 0°C

WBA1, 2, 3 = 54°C

WBB1, 2, 3 = 10°C

WBC1, 2, 3 = 0°C

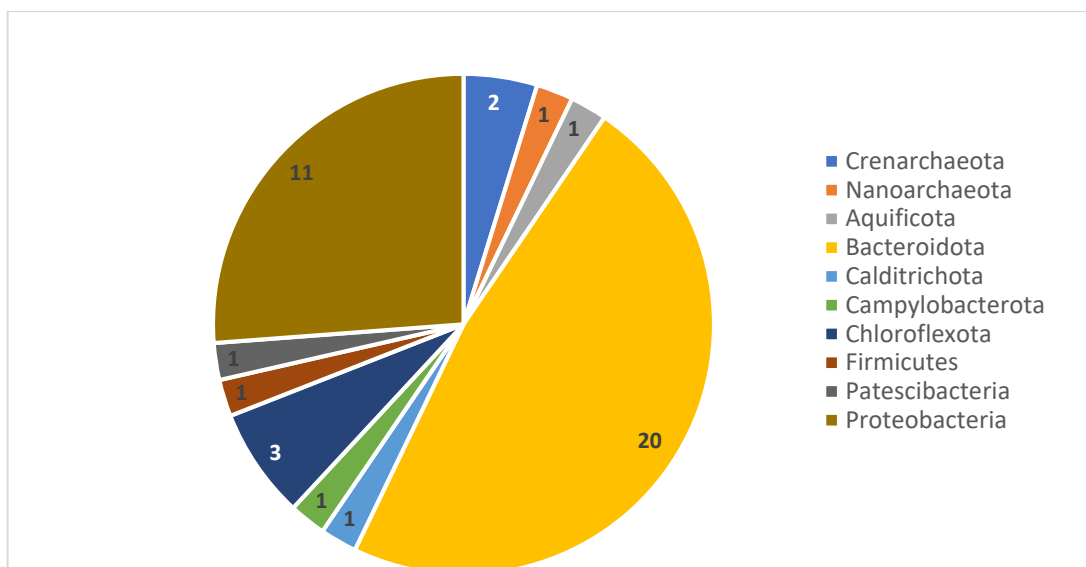


Figura 23. Identificação a nível de Filo dos genomas reconstruídos a partir dos metagenomas (MAGs) da Ilha Deception, Antártica. Fonte: Autores.

Ao total, foram recuperados 43 genomas, sendo 39 caracterizados como pertencentes ao Domínio Bacteria. Compostos por 8 filios, sendo que Bacteroidetes seguido por Proteobacteria, foram predominantes, corroborando com os dados obtidos pela análise no MG-RAST. É a primeira vez que a estratégia de reconstrução de genomas através de sequências metagenômicas é empregada em amostras de ambientes geotermiais da Antártica. Na Antártica, os trabalhos também são escassos e pode-se citar um estudo publicado recentemente, no qual foram reconstruídos genomas de metagenomas provenientes do lago Vanda, em Wright Valley (ZAIKOVA et al., 2019). Os autores recuperaram 16 MAGs com completude >90% e contaminação <5%, e estes foram identificados como pertencentes a quatro filios bacterianos, Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria e Firmicutes.

Os Filios predominantes detectados na Ilha Deception por metagenômica, também foram observados pela análise de amplificação do gene RNAr 16S, realizado por Bendia et al. (2018b), onde foi detectado a abundância de 48% de Proteobacteria e 19% de Bacteroidetes.

Os filios encontrados na análise metagenômica e a maior abundância dos filios Proteobacteria e Bacteroidetes é consistente com os relatos anteriores em ambientes antárticos e geotermiais. Na Antártica foram descritos a presença dos Filios Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Planctomycetes, Verrucumicrobia e Chloroflexi, detectados em diferentes

ecossistemas por Yergeau et. (2007), Bottos et al. (2014) e mais recentemente por Shivaji et al. (2017) e Lambrechts et al. (2019), assim como demonstraram a ampla distribuição e predominância dos Filos Proteobacteria e Bacteroidetes. O mesmo é reportado nos trabalhos de Strazzulli et al. (2017) e Power et al. (2018), que analisaram a composição e diversidade microbiana de sítios geotermiais dos Estados Unidos, México, Itália, Islândia e Nova Zelândia por meio de análises metagenômicas e de sequenciamento de *amplicon* (gene RNAr 16S), e observaram a prevalência de membros dos Filos Proteobacteria e Bacteroidetes.

O Filo Bacteroidetes é composto por membros que habitam os mais diversos ambientes, como solos, sedimentos e coluna d'água e são membros importantes do bacterioplâncton (FERNÁNDEZ-GÓMEZ et al., 2013; SINHA et al., 2017). É possível que a ampla distribuição do Filo Bacteroidetes nos sedimentos da Ilha Deception seja também devido à influência marinha forte sobre os ambientes geotermiais amostrados.

Nos metagenomas analisados pelo MG-RAST, também houve destaque para o Filo Firmicutes nas amostras da fumarola de Fumarole Bay, com temperatura ambiente de 98°C. Adicionalmente, quando comparado aos dados obtidos pelo isolamento bacteriano nesta mesma amostra (discutidos no Capítulo 3), recuperou-se apenas membros pertencentes ao Filo Firmicutes, assim como em todas as demais amostras analisadas.

Membros do Filo Firmicutes não são comumente encontrados em proporção substancial em ambientes Antárticos (BOTTOS et al., 2014), de acordo com métodos dependentes e independentes de cultivo, apenas em solos associados à raízes das plantas existentes na Antártica (TEIXEIRA et al., 2010). Já em ambientes geotermiais antárticos, que apresentam alta temperatura juntamente com diferentes estresses ambientais, há a prevalência de Firmicutes, detectados por técnica independente de cultivo (MUÑOZ et al., 2011), que utilizou DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) para avaliar a estrutura das comunidades microbianas, e métodos dependentes de cultivo (LLARCH et al., 1997; MUÑOZ et al., 2011; SCHULTZ et al., dados não publicados).

Isso se deve ao fato de que representantes do Filo Firmicutes possuem diferentes adaptações estruturais e metabólicas, e uma delas é a capacidade de formar endósporos e resistirem ao ambiente extremo (WÖRMER et al., 2019), como relatado por Medrano-Santillana et al. (2017) e Strazzulli et al. (2017), que observaram

maior abundância de Firmicutes nos ambientes termofílicos do México (vulcão) e Malásia (fonte termal), respectivamente, onde as temperaturas variavam de 56 a 110°C. Dessa maneira, os membros de Firmicutes resistem a condições de altas temperaturas e é provável que, por este motivo, foram mais abundantes na fumarola de 98°C na análise metagenômica.

Os três grupos taxonômicos mais abundantes nos sedimentos da Ilha Deception possuem representantes com capacidades de degradação de uma variedade de frações dos hidrocarbonetos de petróleo e em produzir biossurfactantes com diferentes propriedades, como é apontado por diferentes trabalhos, que citam a presença desses grupos, principalmente Proteobacteria, em eventos de derramamento de petróleo em solo e ambiente marinho (HEAD et al., 2006; BROOIJMANS et al., 2009), reservatórios de óleo (PANNEKENS et al., 2019) e também em ambientes extremos, como a Antártica (GREER et al., 2010; CURY et al., 2015).

5.4.3 Análise funcional dos metagenomas da Ilha Deception

Os perfis funcionais para o nível I da classificação do SEED *subsystem*, detectados através do MG-RAST, estão apresentados na Figura 24.

Observa-se que as amostras agruparam-se em três grupos: as amostras que compreendem a fumarola com temperatura ambiental de 98°C, mais distante; as amostras com temperatura de 0°C, compreendendo as amostras de geleiras, tanto de Fumarole Bay quanto Whalers Bay; e as amostras de fumarolas com temperaturas variando de 10 a 80°C.

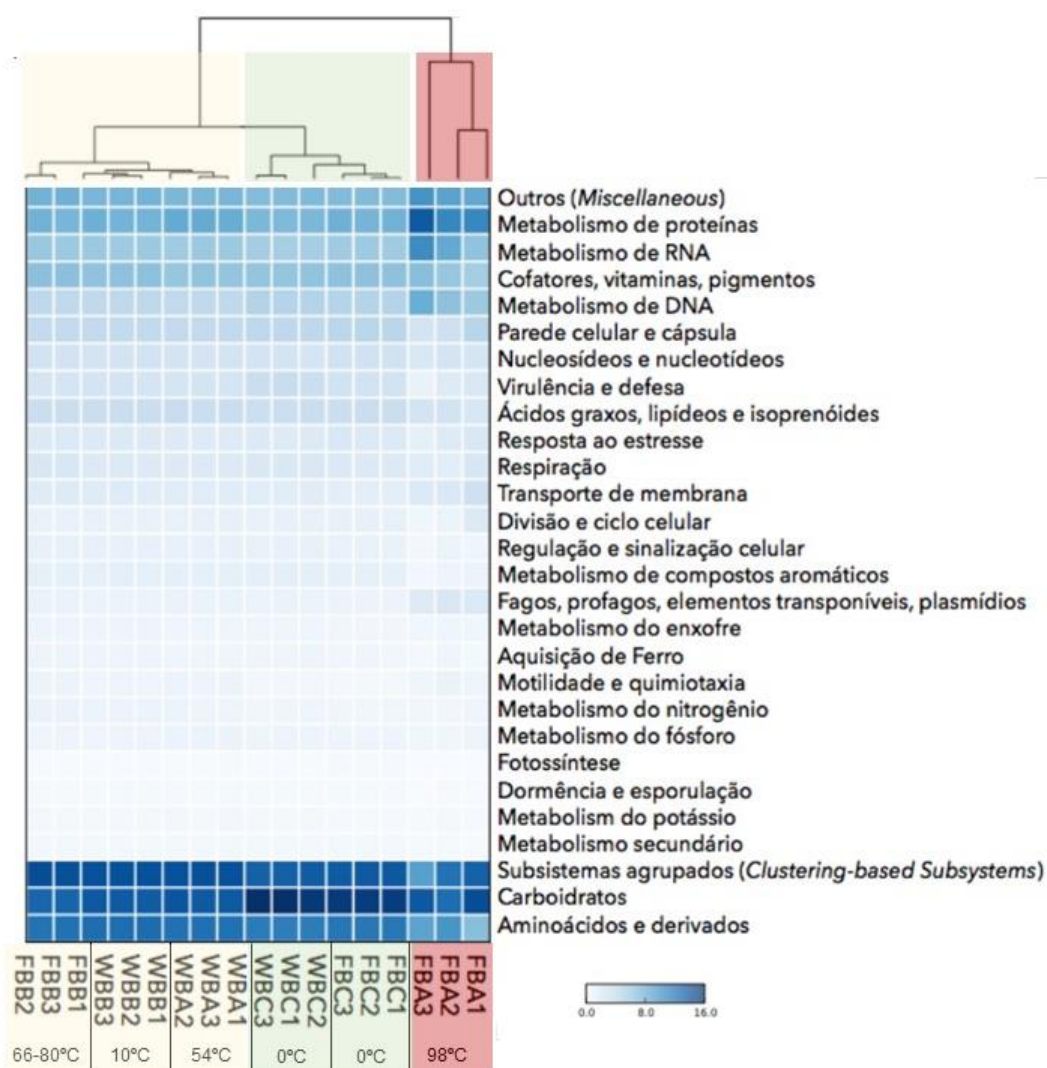


Figura 24. Perfis funcionais das comunidades microbianas de Deception, classificadas em nível I do SEED *Subsystem*, disponível no MG-RAST e exibidos em *Heatmap*. Fonte: Adaptado de Bendia (2016).

Quanto aos perfis funcionais, pode-se observar uma maior abundância de genes relacionados ao metabolismo de proteínas, RNA e DNA nas amostras de 98°C, quando comparada às demais amostras. Também nota-se que o metabolismo de aminoácidos e derivados apresenta elevada abundância relativa em todas as amostras, bem como o metabolismo de carboidratos, porém, ainda exibe uma maior abundância nas amostras de 0°C em relação às amostras das fumarolas. As demais funções classificadas distribuem-se de forma homogênea entre as amostras.

A partir do nível I do SEED *subsystem*, focou-se no metabolismo de compostos aromáticos, devido à relevância da degradação de compostos aromáticos neste trabalho, mesmo não sendo uma das categorias metabólicas mais abundantes.

Para o número de genes relacionados ao metabolismo de compostos aromáticos presentes na Ilha Deception, as triplicatas foram agrupadas, e o resultado pode ser observado na Figura 25. Nota-se que o número de genes se manteve aproximado nas amostras, exceto para a amostra de fumarola de Fumarole Bay com temperatura de 98°C, que apresentou a presença de menos genes em relação aos demais.

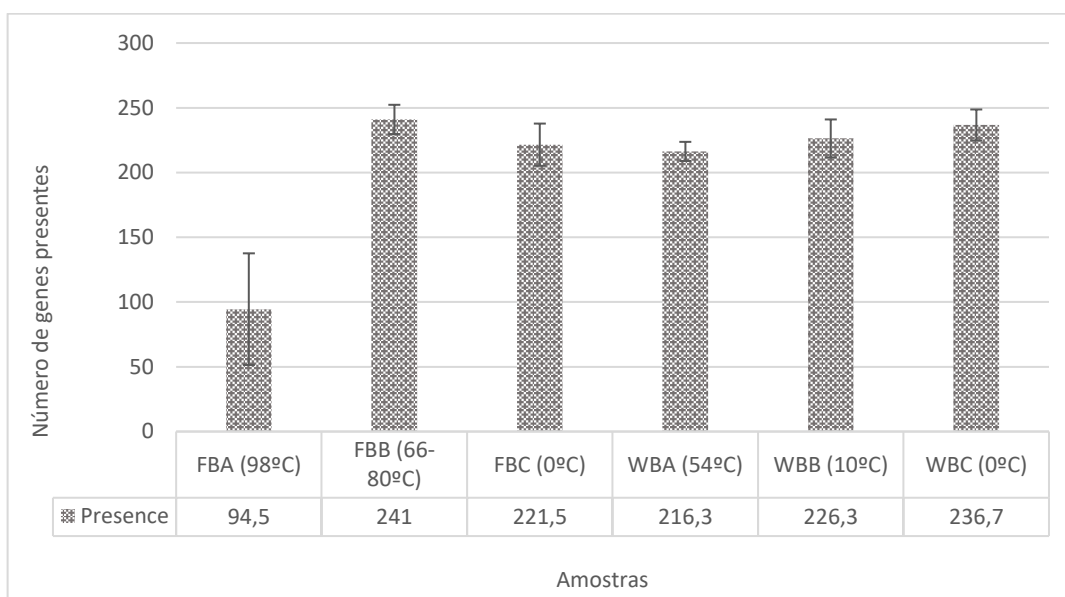


Figura 25. Número de genes presentes para o metabolismo de compostos aromáticos (nível I do SEED *subsystem*). Fonte: Autores.

Estes genes estão vinculados a três diferentes metabolismos (nível II da classificação do SEED *subsystem*): vias periféricas para catabolismo de compostos aromáticos, metabolismo de intermediários aromáticos centrais e degradação anaeróbica de compostos aromáticos. A abundância relativa dos genes para essas funções nos ambientes amostrados pode ser observada na Figura 26.

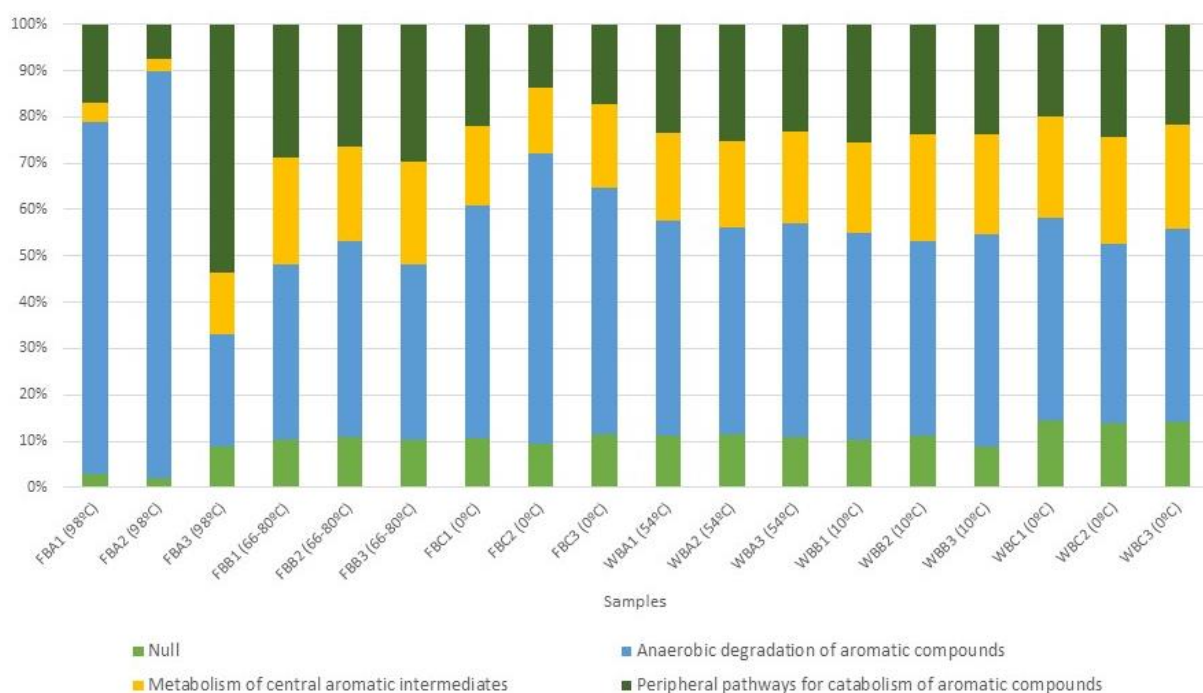


Figura 26. Abundância relativa para as sequências vinculadas ao nível II do SEED *subsystem* do metabolismo de degradação de compostos aromáticos. Fonte: Autores.

Todas as amostras apresentaram maior abundância de sequências relacionadas ao metabolismo de degradação anaeróbica de compostos aromáticos, porém, nas amostras da fumarola de 98°C (FBA1 e FBA2), a abundância relativa foi mais proeminente. Este aumento pode estar possivelmente vinculado à degradação de compostos aromáticos em condição anaeróbica pelo grupo Archaea, visto que apresentou maior abundância na análise taxonômica nesta amostra e também foi relatado por Bendia et al. (2018b) a presença de arqueias do grupo Desulfurococcales, que possuem membros essencialmente hipertermofílicos (85 a 106°C) e vivem em condições principalmente anaeróbicas (HUBER; STETTER, 2001). Já a diferença entre as triplicatas pode ter ocorrido pela formação de micro-nichos em decorrência dos gradientes ambientais acentuados em curta distância, fazendo com que os microrganismos se distribuam e se aglomerem nesses nichos, conforme suas características fisiológicas (CAO et al., 2012).

Nas amostras de Fumarole Bay (66-80°C), houve uma diminuição do metabolismo anaeróbico e um aumento na presença de genes para vias periféricas para catabolismo de compostos aromáticos, que se refere a uma série de reações enzimáticas para degradar compostos para que sejam mais eficientemente

metabolizados por vias metabólicas centrais (PÉREZ-PANTOJA et al., 2012). Para as demais amostras, com temperaturas ambientais mais baixas, observa-se uma homogeneidade.

A predominância de degradação anaeróbica pode estar, possivelmente, relacionada à composição físico-química do local. Um dos principais gases que compõem as fumarolas dos ambientes geotermiais de Fumarole Bay e Whalers Bay na Ilha Deception é o sulfeto de hidrogênio (H_2S) (BENDIA et al., 2018b). O H_2S pode ser metabolizado por uma grande variedade de grupos bacterianos e de arqueias, dando origem a compostos oxidados de enxofre, como o sulfato (SO_4^{2-}) (MADIGAN et al., 2016). De acordo com Pereira et al. (2011), o metabolismo de redução de sulfato consiste na obtenção de energia pela oxidação de compostos orgânicos (quimiorganotróficos) ou hidrogênio molecular (quimiolitotróficos), a partir da redução de sulfato (SO_4^{2-}) em sulfeto de hidrogênio (H_2S). Como mencionado, tanto bactérias quanto arqueias são capazes de realizar este metabolismo, sendo a maioria destes microrganismos estritamente anaeróbios.

No que diz respeito à degradação do petróleo, vários subsistemas envolvidos no metabolismo de compostos aromáticos foram detectados a partir da análise dos perfis funcionais para o nível III da classificação do SEED *subsystem* e estão apresentados na Figura 27. Ao total, as sequências foram enquadradas em 32 subsistemas.

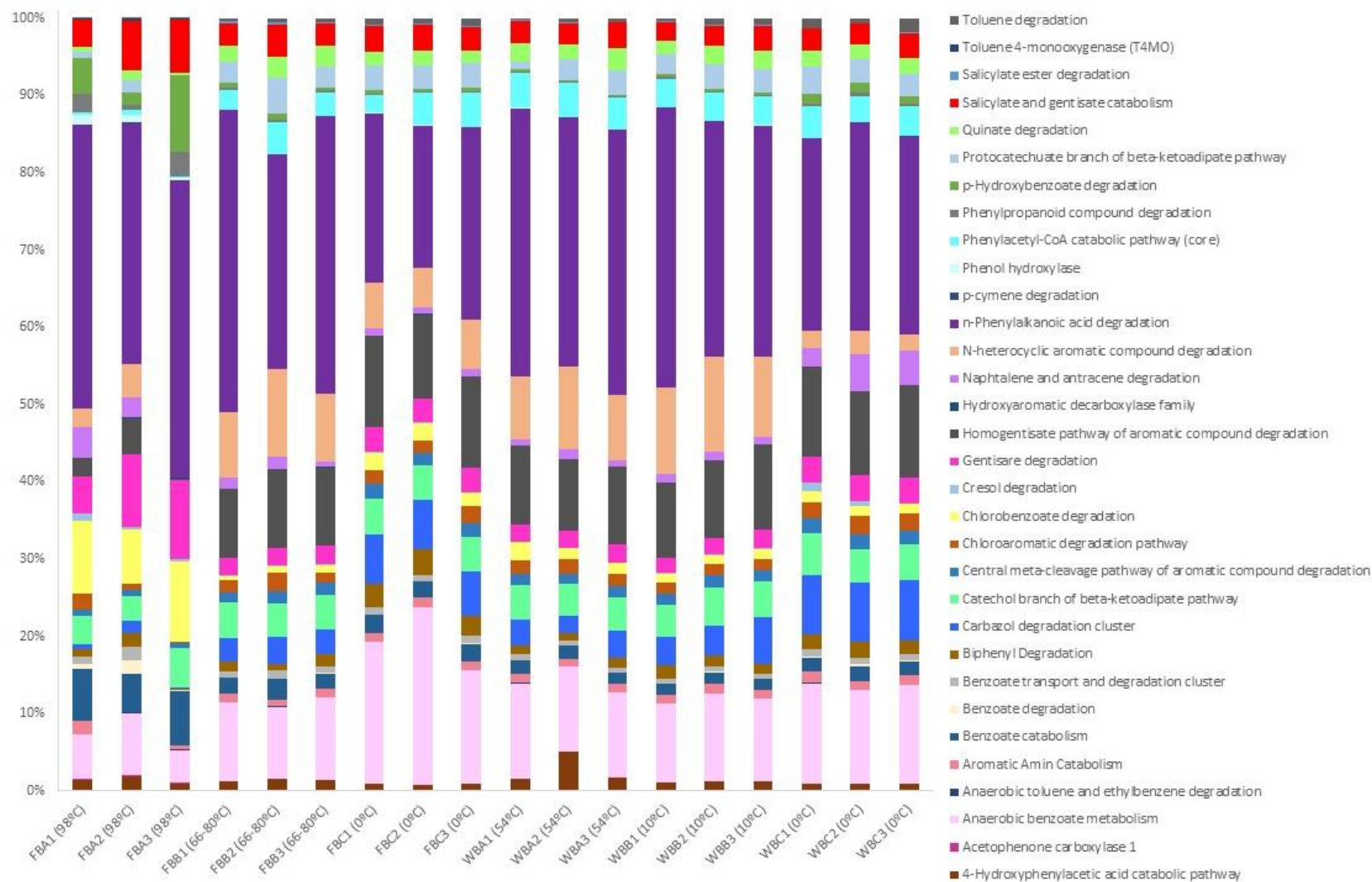


Figura 27. Abundância relativa da anotação funcional para os genes vinculados ao nível III do SEED *subsystem* do metabolismo de degradação de compostos aromáticos. Fonte: Autores.

No nível III do SEED *subsystem* estão importantes vias relacionadas à degradação de compostos aromáticos, podendo-se citar: a degradação do bifenil, degradação do benzoato, degradação do fenol, degradação do naftaleno e antraceno, degradação do ácido n-fenilalcanóico e outros. Dentro deste nível, observou-se que a maior abundância e atividade foram relacionadas à degradação do ácido n-fenilalcanóico, em todas as amostras.

Para esta degradação, foi observada a presença das enzimas ligase coenzima A de ácido graxo de cadeia longa (EC 6.2.1.3), enoil-CoA hidratase (EC 4.2.1.17), 3-OH-acil-CoA desidrogenase (EC 1.1.1.35), cis-trans-D3-D2-enoil-CoA isomerase (EC 5.3.3.8), 3-OH-butiril-CoA epimerase (EC 5.1.2.3) e 3-cetoacil-CoA tiolase (EC 2.3.1.16), que são proteínas relacionadas à via da β -oxidação, responsável pela degradação de ácidos graxos. Sua indução ocorre pelo crescimento em ambientes contendo ácidos graxos de cadeia longa como fonte de carbono e energia (DIRUSSO, 1990). Adicionalmente, Oliveira et al. (2001) relatou que os genes e as enzimas envolvidas na β -oxidação do ácido n-fenilalcanóico em *Pseudomonas putida* também demonstraram papel essencial na síntese de novos poliésteres aromáticos biodegradáveis (bioplásticos), que pode ser utilizado como fonte de carbono quando a do ambiente tiver sido esgotada.

Dentre todas as sequências gênicas encontradas no metagenoma, as que codificam a proteína ligase CoA de ácido graxo de cadeia longa (EC 6.2.1.3) foi a mais abundante, em todas as amostras. Esta proteína desenvolve um papel importante em vários processos metabólicos e regulatórios, catalizando a formação de acil-CoA através do processo que requer ácido graxos, ATP e coenzima A como substratos (FAERGEMAN et al., 1997). Para a degradação de petróleo, Yao et al. (2013) observaram a presença deste gene que codifica para a enzima ligase (EC 6.2.1.3) no genoma bacteriano de *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 e a ausência do mesmo no genoma de *Geobacillus thermodenitrificans* DSM465, a qual é incapaz de degradar alcanos. De acordo com Verde (2014), a proteína ligase CoA de ácido graxo de cadeia longa pode estar envolvida no passo inicial da degradação de petróleo.

Em seguida, houve a abundância da degradação anaeróbia do benzoato (metabolismo anaeróbico), degradação de composto aromático heterocíclico e vias homogentisato da degradação de compostos aromáticos (metabolismo central). Entretanto, para as amostras da fumarola de 98°C, a abundância foi maior para

degradação do ácido n-fenilalanóico, seguido da degradação de gentisato e degradação de clorobenzoato.

Vale destacar também que o catabolismo de benzoato, catabolismo de salicilato e gentisato (metabolismo central), e degradação de hidroxibenzoato (via periférica) apresentaram maior abundância nas amostras da fumarola de 98°C quando comparadas com as demais amostras, enquanto que para os genes relacionados ao cluster de degradação de carbazol, degradação de quinato, via catabólica de fenilacetil-CoA, ramo catecol da via β -cetoadipato e via central de meta-clivagem de compostos aromáticos, estiveram mais abundantes nas amostras com temperaturas inferiores a 80°C.

A abundância de sequências associadas às vias de degradação do benzoato pode ser explicada pelo fato que o benzoato é um composto intermediário central no processo anaeróbico e aeróbico de vários compostos aromáticos, como por exemplo tolueno, xileno, carbazol e bifenil (KIM; HARWOOD, 1991). A enzima chave envolvida na degradação do benzoato via hidroxilação é o catecol 1,2-dioxigenase (EC 1.13.11.1), que foi observada na anotação funcional. O benzoato é convertido em benzoil-CoA seguindo as vias de degradação aeróbica e anaeróbica (SHINODA et al., 2004). Conforme Valderrama et al. (2012), a degradação bacteriana do benzoato no meio ambiente reflete a estratégia biológica das comunidades microbianas para aumentar a aptidão das células contra os contaminantes aromáticos.

Quanto às demais sequências encontradas, a via central de meta-clivagem é utilizada por muitos organismos que degradam grande quantidade de fenol (MAHIUDDIN et al., 2012). Já o salicilato e gentisato são reconhecidos como intermediários no metabolismo do naftaleno (BALACHANDRAN et al., 2012).

Algumas das principais vias de clivagem de anéis para compostos aromáticos foram observadas nos metagenomas de Deception: a via β -cetoadipato com seus ramos de catecol, ramo protocatechuate da via do β -cetoadipato, via do gentisato, via homogentisato, via fenilacetil-CoA e via benzoil-CoA. Com essas informações, pode-se inferir que os compostos aromáticos são degradados em Deception, gerando compostos mais facilmente metabolizados pelas bactérias.

Juntamente com a identificação da abundância das vias de degradação do ácido n-fenilalanóico, degradação de benzoato e degradação de salicilato e gentisato, e as enzimas envolvidas, mencionadas anteriormente, sugere-se que os

sedimentos da Ilha Deception apresentam um alto potencial de degradação de hidrocarbonetos.

Esses dados dão *insights* da capacidade de degradação de hidrocarbonetos de petróleo pela comunidade microbiana na Ilha Deception em caso de contaminação ambiental, oferecendo direcionamentos para a implementação de estratégias de biorremediação, como por exemplo, adicionar grupos microbianos específicos para a degradação, adição de estratégias de bioestímulo ou da atenuação natural dos compostos pela comunidade microbiana existente.

Entretanto, vale ressaltar que análises aprofundadas com genes específicos marcadores de degradação de hidrocarbonetos de petróleo devem ser realizados com amostras da Ilha Deception, tanto com análises *in silico*, minerando essas informações nos metagenomas, quanto a execução de análises de cultivo utilizando diferentes hidrocarbonetos de petróleo como fonte de carbono e observando a resposta e a modulação da comunidade microbiana frente ao contaminante.

5.4.4 Considerações

Esse capítulo teve o objetivo de avaliar, em caráter inicial, a estrutura da comunidade microbiana de dois ambientes geotermais da Antártica e o seu potencial genético para degradação de hidrocarbonetos de petróleo. Isso foi alcançado por meio do uso da análise metagenômica, que permite a exploração da composição microbiana e as funções associadas e de interesse, sem a necessidade de cultivo.

Sumarizando os resultados encontrados nesse capítulo:

- A análise taxonômica dos metagenomas da Ilha Deception mostrou a abundância dos Filos Bacteroidetes e Proteobacteria nas amostras com temperatura ambiental inferior a 80°C, e de Firmicutes nas amostras de fumarola com temperatura de 98°C, do sítio geotermal Fumarole Bay;
- A análise funcional revelou a prevalência da degradação anaeróbica dos compostos aromáticos em todas as amostras;
- Houve a presença de um total de 32 vias metabólicas diferentes para a degradação de compostos aromáticos nos metagenomas da Ilha Deception, e que indicaram a maior abundância para degradação do ácido n-fenilalcanóico e degradação do benzoato;

- Foram identificadas sequências associadas às principais vias de degradação de compostos aromáticos e de enzimas-chave no processo, indicando o potencial metabólico para degradação pela comunidade microbiana existente nos ambientes geotermiais de Deception;
- A capacidade de degradação de hidrocarbonetos de petróleo pela comunidade microbiana da Ilha Deception deve ser estudada de forma mais aprofundada, com ferramentas *in silico* nos metagenomas e com métodos de cultivo.

A identificação taxonômica e funcional da comunidade microbiana fornece informações relevantes quanto ao potencial de degradação de compostos aromáticos, podendo auxiliar na elaboração de uma estratégia eficiente para a aplicação da técnica de biorremediação em ambientes contaminados. Adicionalmente, as informações sobre a composição da comunidade microbiana que está dominante e foi obtida dos ambientes geotermiais por meio de método independente de cultivo, podem abrir caminhos para o isolamento exaustivo e a caracterização de espécies potenciais com as funções para biorremediação de ambientes contaminados.

6. CONCLUSÃO GERAL

Objetivou-se com a proposta do presente trabalho a avaliação da composição e diversidade das comunidades bacterianas termofílicas presentes em ambientes geotermiais do vulcão ativo Ilha Deception, localizado na Antártica, e analisar o seu potencial metabólico para degradação de hidrocarbonetos de petróleo e produção de biossurfactante, no intuito de bioprospectar aplicação em processos de biorremediação e recuperação avançada do óleo.

Para atingir o objetivo, primeiramente foi realizado um levantamento para averiguar o potencial de aplicação biotecnológica que os ambientes extremos os microrganismos extremofílicos fornecem.

Com base nos dados encontrados, foi possível concluir que os microrganismos que habitam a extremobiosfera possuem grande potencial biotecnológico, pois apresentam características únicas que lhes permitem atuar em condições ambientais extremas; e esses diferenciais podem ser amplamente utilizados em diferentes aplicações industriais que utilizam condições extremas no processo. Os dados também sugeriram que, apesar do conhecimento de que ambientes extremos e extremofílicos são fonte de novas biomoléculas com propriedades únicas, como por exemplo os termofílicos, pouca atenção foi atraída para a área de produção de biossurfactante. Pelas suas propriedades emulsificantes e ação tensioativa, os biossurfactantes podem ser utilizados em diferentes vertentes industriais, sendo que a maioria dos estudos realizados visa a aplicação na indústria do petróleo. Verificou-se também que existe um interesse crescente das indústrias por surfactantes ecológicos biodegradáveis, com baixa toxicidade, e por biossurfactante ativo e estável em condições extremas. Portanto, torna-se imprescindível acessar áreas subexploradas com alta importância biotecnológica, como a busca por biossurfactantes de microrganismos que vivem em ambientes geotermiais e seu potencial de aplicação em diferentes setores industriais.

Vindo de encontro com o atual cenário da bioprospecção do potencial biotecnológico de extremofílicos e de explorar ambientes únicos para busca de bioprodutos, como um vulcão polar ativo da Antártica, a presente tese enfrentou esta questão com duas abordagens complementares, por meio de análises metagenômicas, bem como por isolamento bacteriano e análise genômica.

Na análise metagenômica, realizada em amostras com diferentes temperaturas em dois ambientes geotermiais da Ilha Deception, verificou-se a presença de diferentes Filos, mas com abundância de Bacteroidetes e Proteobacteria nas amostras com temperatura ambiental inferior a 80°C, e de Firmicutes nas amostras de fumarola com temperatura de 98°C, localizado no sítio geotermal Fumarole Bay. A recuperação de genomas a partir dos metagenomas corroboraram com os dados de abundância de Bacteroidetes e Proteobacteria.

Por meio da análise dos metagenomas, com o foco na degradação de compostos aromáticos, também foi possível observar a prevalência da degradação anaeróbica desses compostos e 32 vias metabólicas diferentes para a degradação de compostos aromáticos nos metagenomas da Ilha Deception foram identificados. Adicionalmente, a maior abundância encontrada das sequências anotadas foi para a degradação do ácido n-fenilalcanóico, e foram observadas as principais vias de degradação de compostos aromáticos e de enzimas-chave no processo, indicando o potencial metabólico para degradação pela comunidade microbiana existente nos ambientes geotermiais de Deception.

Através de métodos dependentes de cultivo, 159 isolados bacterianos termofílicos foram obtidos de dois ambientes geotérmicos da Ilha Deception, no qual as temperaturas ambientais variaram de 50 a 100°C. Estes foram identificados, em sua grande maioria, como pertencentes aos gêneros *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Brevibacillus*, que são gêneros bacterianos formadores de esporos, sugerindo a importância da formação de esporos para a resistência local. Também houve a detecção de um isolado caracterizado como *Atopococcus*, que, até onde se tem conhecimento, é a primeira vez que o gênero foi isolado de amostra Antártica.

Termofílicos capazes de degradar petróleo (óleo cru) e produzir biossurfactantes em condições de temperatura elevada foram reportados de forma inédita para a Ilha Deception, com 4 estirpes apresentando as duas habilidades e com os resultados mais promissores: 3 estirpes bacterianas isoladas de Fumarole Bay – FB2_38 (*Atopococcus*), FB3_54 (*Geobacillus*), FB4_88 (*Geobacillus*) e 1 estirpe de Whalers Bay – WB1_122 (*Anoxybacillus*).

Todas as estirpes isoladas, utilizando diferentes meios de cultura, foram classificadas como pertencentes ao Filo Firmicutes, e este Filo é encontrado em baixa abundância nos sedimentos da Ilha Deception, conforme técnicas de sequenciamento

do RNAr 16S e de metagenomas (*Shotgun*). Dessa maneira, mostrou-se o potencial de degradação de petróleo e de produção de biossurfactantes por bactérias que não são dominantes no ambiente geotermal Antártico.

Por meio das análises genômicas das duas estirpes bacterianas termofílicas que tiveram seu genoma completo sequenciado, *Geobacillus* sp. LEMMJ02 e *Brevibacillus* sp. LEMMJ03, pode-se verificar a presença de genes anotados para a degradação de compostos aromáticos, como fluoreno, naftaleno, antraceno, tolueno e xileno, assim como para metabólitos secundários, como terpenos, bacteriocinas, fengicina em *Geobacillus* e ectoína em *Brevibacillus*. Adicionalmente, nenhum gene de resistência foi detectado. Dessa maneira, pode-se explorar o potencial dessas bactérias termofílicas para outras áreas além da indústria do petróleo, como produção de novos fármacos e utilização na indústria alimentícia.

Os resultados do presente trabalho demonstram o potencial da abordagem combinada de metagenômica e de cultivo para investigar a diversidade bacteriana em ambientes extremos, como ambientes geotermais Antárticos, e obter informações sobre as funcionalidades destes no ambiente.

Estes resultados representam os primeiros avanços sobre a diversidade taxonômica autóctone da Ilha Deception e seu potencial metabólico para degradação de hidrocarbonetos de petróleo e na produção de biossurfactantes. Estas são informações iniciais e relevantes visando a bioprospecção para aplicação em processos de biorremediação de ambientes extremos e para a recuperação microbiana avançada do óleo (MEOR) no reservatório, pois fornecem direcionamentos sobre as estratégias que devem ser implementadas para que sejam eficientes.

Este trabalho é precursor na exploração do potencial metabólico para a degradação de hidrocarbonetos de petróleo e produção de biossurfactante por bactérias termofílicas da Antártica e espera-se a continuidade e aprofundamento do estudo visando a aplicação em biorremediação de ambientes extremos contaminados por petróleo e da recuperação avançada do óleo em reservatórios.

7 PERSPECTIVAS

A partir da realização do presente trabalho, observou-se a necessidade de novos estudos visando o avanço da compreensão do potencial biotecnológico da diversidade extremofílica presente na Ilha Deception. Também ressalta-se a necessidade da continuidade do projeto para aplicação de termofílicos do vulcão Antártico, Ilha Deception, nas estratégias de biorremediação de ambientes extremos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, bem como da utilização de bioprodutos desses termofílicos nos processos de MEOR nos reservatórios de petróleo.

Dessa maneira, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, propõe-se:

- Aprofundamento e refinamento das análises taxonômicas e funcionais dos genomas recuperados a partir dos metagenomas da Ilha Deception, como anotação funcional específica com genes e vias de interesse para degradação de hidrocarbonetos de petróleo e produção de biossurfactantes, associando com a comunidade microbiana presente na Ilha Deception;
- Análises dos genomas completos sequenciados (99 isolados bacterianos termofílicos), explorando o potencial metabólico, com ênfase na degradação de hidrocarbonetos e produção de metabólitos secundários;
- Comparação entre os metagenomas vulcânicos da Ilha Deception, na Antártica, com os demais metagenomas de vulcão disponíveis em base de dados, a fim de elucidar a composição microbiana e suas funcionalidades nesses ambientes termofílicos para a degradação de hidrocarbonetos de petróleo;
- Análise da degradação de diferentes frações do petróleo pelas bactérias termofílicas da Antártica;
- Desenvolvimento de um consórcio microbiano degradador de hidrocarbonetos de petróleo e produtor de biossurfactante para testes em microcosmos para biorremediação de ambiente termofílico contaminado por petróleo;
- Purificação, identificação e quantificação de biossurfactante produzido pelas bactérias termofílicas;
- Construção de microcosmos para experimento do processo de MEOR em reservatórios com o biossurfactante produzido;

- Otimização da produção de biosurfactante utilizando diferentes substratos e condições ambientais;
- Desenvolvimento de novos meios de cultura e diferentes estratégias de cultivo para o isolamento de microrganismos ainda não cultivável em laboratório ou que estão em baixa abundância nas amostras termofílicas antárticas, através das informações obtidas com os metagenomas;
- Utilização de técnicas baseadas em RNA, como a metatranscriptômica, para responder se os genes detectados na análise metagenômica, que é baseada em DNA, estavam ativos e exercendo às funções encontradas em *Deception*. Até a presente data, nenhum trabalho utilizou a metatranscriptômica para avaliar a atividade microbiana nos ambientes geotermiais da Antártica.

Adicionalmente, a presente tese focou apenas no potencial de bioprospecção de termofílicos das amostras de sedimentos do vulcão ativo Ilha Deception e verificou-se a capacidade de microrganismos degradarem óleo e produzirem biosurfactante estável frente à presença de óleo cru e diesel em condições termofílicas. Com isso, abre-se a possibilidade de estudar diferentes grupos de extremofílicos presentes nessas amostras e explorar o potencial metabólico destes organismos para aplicação em outras áreas industriais, como por exemplo a busca por enzimas termoestáveis.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSEN, E.P. **Oceanographic conditions beneath Fimbul Ice Shelf, Antarctica**. 2012. (Tese de Doutorado). University of Southampton, Reino Unido.
- AGARWAL, A.; LIU, Y. Remediation technologies for oil-contaminated sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 101, n. 2, p. 483-490, 2015.
- AISLABIE, J.M.; BALKS, M.R.; FOGHT, J.M.; WATERHOUSE, E.J. Hydrocarbon spills on Antarctic soils: effects and management. **Environ Sci Technol.**, v. 38, p. 1265-1274, 2004.
- AISLABIE, J.; SAUL, D.J.; FOGHT, J.M. Bioremediation of hydrocarbon contaminated polar soils. **Extremophiles**, v. 10, p. 171-179, 2006.
- AISLABIE, J.; RYBURN, J.; SARMAH, A. Hexadecane mineralization activity in ornithogenic soil from Seabee Hook, Cape Hallett, Antarctica. **Polar Biol.**, v. 31, n. 4, p. 421-428, 2008.
- AISLABIE, J.; FOGHT, J.M. **Response of polar soil bacterial communities to fuel spills**. In: Bej AK, Aislabie J, Atlas RM (eds) The ecology, biodiversity and bioremediation potential of microorganisms in extremely cold environments, Taylor & Francis, Florida, 215-230p., 2010.
- AKONDI, K.B.; LAKSHMI, V.V. Emerging trends in genomic approaches for microbial bioprospecting. **OMICS**, v. 17, n. 2, p. 61-70, 2013.
- ALNEBERG, J.; BJARNASON, B.S.; DE BRUIJN, I.; SCHIRMER, M.; QUICK, J.; IJAZ, U.Z.; et al. Binning metagenomic contigs by coverage and composition. **Nat. Methods**, v. 11, p. 1144-1146, 2014.
- AMANN, R.L.; LUDWING, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, v. 59, p. 143-169, 1995.
- AMENÁBAR, M.J.; FLORES, P.A.; PUGIN, B.; BOEHMWALD, F.A.; BLAMEY, J.M. Archaeal diversity from hydrothermal systems of Deception Island, Antarctica. **Polar Biology**, v. 36, n. 3, p. 373-380, 2013.
- ANTRANIKIAN, G.; VORGIAS, C.E.; BERTOLDO, C. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 96, p. 219-62, 2005.
- ARMIENTI, P.C.; INNOCENTI, F.; MANETTI, P.; TRIPODO, A.; VILLARI, L.; VITA, G. New petrological and geochemical data on Mt. Melbourne Volcanic Field, Northern Victoria Land, Antarctica. (II Italian Antarctic Expedition). **Memorie della Società Geologica Italiana**, v. 46, p. 397-424, 1991.

ATLAS, R.M. Bioremediation of petroleum pollutants. **Int Biodeterior Biodegr.**, v. 35, p. 317-327, 1995.

ATLAS, R.; BRAGG, J.R. Bioremediation of marine oil spills: when and when not - the Exxon Valdez experience. **Microbial Biotechnol.**, v. 2, p. 213-221, 2009.

ATLAS, R.M.; HAZEN, C.T. Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in U. S. history. **Environ Sci Technol.**, v. 45, n. 16, p. 6709-6715, 2011.

ATUANYA, E.I.; DUNKWU-OKAFOR, A.; UDOCHUKWU, U. Production of Biosurfactants by Actinomycetes Isolated from Hydrocarbon Contaminated Soils and Ikpoba River Sediments in Benin-City, Nigeria. **Nigerian Journal of Basic and Applied Science**, v. 24, n. 2, p. 45-52, 2016.

AUNG, H.L.; SAMARANAYAKA, C.U.; ENRIGHT, R.; BEGGS, K.T.; MONK, B.C. Characterization of the DNA gyrase from the thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus*. **Protein Expr Purif.**, v. 107, p. 62-67, 2015.

AZIZ, R.K.; BARTELS, D.; BEST, A.A.; DEJONGH, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R.A.; FORMSMA, K.; GERDES, S.; GLASS, E.M.; KUBAL, M.; MEYER, F.; OLSEN, G.J.; OLSON, R.; OSTERMAN, A.L.; OVERBEEK, R.A.; MCNEIL, L.K.; PAARMANN, D.; PACZIAN, T.; PARRELLO, B.; PUSCH, G.D.; REICH, C.; STEVENS, R.; VASSIEVA, O.; VONSTEIN, V.; WILKE, A.; ZAGNITKO, O. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, v. 9, n. 75, 2008.

BALACHANDRAN, C.; DURAIANDIYAN, V.; BALAKRISHNA, K.; IGNACIMUTHU, S. Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. **Bioresour. Technol.**, v. 112, p. 83-90, 2012.

BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A.A.; DVORKIN, M.; KULIKOV, A.S.; LESIN, V.M.; NIKOLENKO, S.I.; PHAM, S.; PRJIBELSKI, A.D.; PYSHKIN, A.V.; SIROTKIN, A.V.; VYAHHI, N.; TESLER, G.; ALEKSEYEV, M.A.; PEVZNER, P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **J Comput Biol.**, v. 19, n. 5, p. 455-477, 2012.

BARCLAY, A.H.; WILCOCK, W.S.D.; IBÁÑEZ, J.M. Tectonic and volcanic influences at Deception Island, South Shetland Islands, **Antarct. Sci.**, v. 21, n. 2, p. 153-167, 2009.

BARGAGLI, R. Environmental contamination in Antarctic ecosystems. **Sci Total Environ.**, v. 400, p. 212-226, 2008.

BARGAGLI, R.; BROADY, P.A.; WALTON, D.W.H. Preliminary investigation of the thermal biosystem of Mount Rittmann fumaroles (northern Victoria Land, Antarctica). **Antarctic Science**, v. 8, n. 2, p. 121-126, 1996.

BARTOLINI, S.; GEYER, A.; MARTÍ, J.; PEDRAZZI, D.; AGUIRRE-DÍAZ, G. Volcanic hazard on deception Island (South Shetland Islands). **Journal of Volcanology and Geothermal Research**, v. 285, p. 150-168, 2014.

BASHIR, Y.; SINGH, S.P.; KONWAR, B.K. Metagenomics: An Application Based Perspective. **Chinese Journal of Biology**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

BELL, R.E.; FERRACCIOLI, F.; CREYTS, T.T.; BRAATEN, D.; CORR, H.; DAS, I.; DAMASKE, D.; FREARSON, N.; JORDAN, T.; ROSE, K.; STUDINGER, M.; WOLOVICK, M. Widespread Persistent Thickening of the East Antarctic Ice Sheet by Freezing from the Base. **Science**, v. 331, p. 1592-1595, 2011.

BELL, T.H.; YERGEAU, E.; MAYNARD, C.; JUCK, D.; WHYTE, L.G.; GREER, C.W. Predictable bacterial composition and hydrocarbon degradation in Arctic soils following diesel and nutrient disturbance. **ISME J.**, v. 7, n. 6, p. 1200-10, 2013.

BENDIA, A. **A vida microbiana em um vulcão antártico: diversidade e adaptação procariótica na Ilha Deception**. 2016. 184f. Tese (Doutorado em Microbiologia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

BENDIA, A.G.; ARAUJO, G.G.; PULSCHEN, A.A.; CONTRO, B.; DUARTE, R.T.D, RODRIGUES, F.; GALANTE, D.; PELLIZARI, V.H. Surviving in hot and cold: psychrophiles and thermophiles from Deception Island volcano, Antarctica. **Extremophiles**, v. 22, p. 917, 2018.

BENDIA, A.G.; SIGNORI, C.N.; FRANCO, D.C.; DUARTE, R.T.D.; BOHANNAN, B.J.M.; PELLIZARI, V.H. A mosaic of geothermal and marine features shapes microbial community structure on Deception Island volcano. Antarctica. **Front Microbiol.**, v. 9, p. 899, 2018.

BERTANI, G. Studies on lysogeny. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol**, v. 62, p. 293-300, 1951.

BLANCO, Y.; PRIETO-BALLESTEROS, O.; GÓMEZ, M.J.; MORENO-PAZ, M.; GARCÍA-VILLADANGOS, M.; RODRÍGUEZ-MANFREDI, J.A.; CRUZ-GIL, P.; SÁNCHEZ-ROMÁN, M.; RIVAS, L.A.; PARRO, V. Prokaryotic communities and operating metabolisms in the surface and the permafrost of Deception Island (Antarctica). **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 2495-2510, 2012.

BOOTHROYD, I.K.G. Ecological characteristics and management of geothermal systems of the Taupo Volcanic Zone, New Zealand. **Geothermics**, v. 38, n. 1, p. 200-209, 2009.

BOTTOS, E.M.; SCARROW, J.W.; ARCHER, S.D J.; MCDONALD, I.R.; CARY, S.C. **Bacterial community structures of Antarctic soils**. In: COWAN, D. (Ed.). Antarctic terrestrial microbiology. New York, Springer, 2014. p. 9-33.

BRAVO, L.A.; GRIFFITH, M. Characterization of antifreeze activity in Antarctic plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 414, p. 1189-1196, 2005.

British Antarctic Survey - Natural Environment Research Council. 2015. Disponível em: <<https://www.bas.ac.uk/>>. Acesso em: 20 jul 2015.

BROOIJMANS, R.J.W.; PASTINK, M.I.; SIEZEN, R.J. Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew. **Microb Biotechnol.**, v. 2, n. 6, p. 587-94, 2009.

BROWN, L. Microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 316-320, 2010.

BUZZINI, P.; BRANDA, E.; GORETTI, M.; TURCHETTI, B. Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. **FEMS Microbiol Ecol.**, v. 82, p. 217-241, 2012.

CABRERIZO, A.; GALBÁN-MALAGÓN, C.; DEL VENTO, S.; DACHS, J. Sources and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Antarctic and Southern Ocean atmosphere. **Glob Biogeochem Cycles**, v. 28, p. 1424-1436, 2014.

CABRERIZO, A.; TEJEDO, P.; DACHS, J.; BENAVAL, J. Anthropogenic and biogenic hydrocarbons in soils and vegetation from the South Shetland Islands (Antarctica). **Sci Total Environ.**, v. 1, p. 569-570, 2016.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, v. 50, p. 520-529, 1998.

CAMERON, J.R.; SUNTHARALINGAM, N.; KENNEY, G.N. **Thermoluminescent dosimetry**. Londres: The Colonial Press, 1968.

CAMERON, R.E.; BENOIT, R.E. Microbial and Ecological Investigations of Recent Cinder Cones, Deception Island, Antarctica. **A Preliminary Report Ecology**, v. 51, n. 5, p. 802-809, 1970.

CAO, P.; ZHANG, L.M.; SHEN, J.P.; ZHENG, Y.M.; DI, H.J.; HE, J.Z. Distribution and diversity of archaeal communities in selected Chinese soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, n. 1, p. 146-158, 2012.

CAPORASO, J.G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; HUNTLEY, J.; FIERER, N.; OWENS, S.M.; BETLEY, J.; FRASER, L.; BAUER, M.; GORMLEY, N.; GILBERT, J. A.; SMITH, G.; KNIGHT, R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, p. 1621-1624, 2012.

CARY, S.C.; MCDONALD, I.R.; BARRETT, J.E.; COWAN, D.A. On the rocks: the microbiology of Antarctic Dry Valley soils. **Nat Rev Microbiol.**, v. 8, p. 129-138, 2010.

CASAMAYOR, E. O; MUYZER, G.; PEDRO, C. Composition and temporal dynamics of planktonic archaeal assemblages from anaerobic sulfurous environments studied by 16S rDNA denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing. **Aquat. Microb. Ecol.**, v. 25, p. 237-246, 2001.

CASELLI, A. T.; SANTOS-AFONSO, M.; AGUSTO, M.R. Gases fumarólicos de la isla Decepción (Shetland del Sur, Antártida): Variaciones químicas y depósitos vinculados a la crisis sísmica de 1999. **Asoc. Geol. Argent. Rev.**, v. 59, p. 291-302, 2004.

CAVA, F.; HIDALGO, A.; BERENQUER, J. *Thermus thermophilus* as biological model. **Extremophiles**, v. 13, p. 213-231, 2009.

CAVICCHIOLI, R. Microbial ecology of Antarctic aquatic systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 691-706, 2015.

CHAI, L.; ZHANG, F.; SHE, Y.; BANAT, I.; HOU, D. Impact of a Microbial-Enhanced Oil recovery field trial on microbial communities in a low-temperature heavy oil reservoir. **Nature Environment and Pollution Technology**, v. 14, n. 3, p. 455-462, 2015.

CHRISTNER, B.C.; MOSLEY-THOMPSON, E.; THOMPSON, L.G.; REEVE, J.N. Isolation of bacteria and 16S rDNAs from Lake Vostok accretion ice. **Environ. Microbiol.**, v. 3, p. 570-577, 2001.

COUTO, C.R.A.; ALVAREZ, V.M.; MARQUES, J.M.; JURELEVICIUS, D.A.; SELDIN L. Exploiting the aerobic endospore-forming bacterial diversity in saline and hypersaline environments for biosurfactant production. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 240, p. 1-17, 2015

COWAN, D.A. (ed.). **Antarctic Terrestrial Microbiology**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2014, pp. 328.

COWAN, D.A.; TOW, L.A. Endangered Antarctic environments. **Annual review of microbiology**, v. 58, p. 649-690, 2004.

CURY, J.C.; JURELEVICIUS, D.A.; VILLELA, H.D.M.; JESUS, H E.; PEIXOTO, R. S.; SCHAEDE, C.E.G.R.; BÍCEGO, M.C.; SELDIN, L.; ROSADO, A.S. Microbial diversity and hydrocarbon depletion in low and high diesel-polluted soil samples from Keller Peninsula, South Shetland Islands. **Antarctic Science**, v. 27, n. 3, p. 263-273, 2015.

CRISAFI, F.; GENOVESE, M.; SMEDILE, F.; RUSSO, D.; CATALFAMO, M.; YAKIMOV, L.; GIULIANO, L.; DENARO, R. Bioremediation technologies for polluted seawater sampled after an oil-spill in Taranto Gulf (Italy): A comparison of biostimulation, bioaugmentation and use of a washing agent in microcosm studies. **Marine Pollution Bulletin**, v. 106, p. 119-126, 2016.

DALMASO, G.Z.L.; FERREIRA, D.; VERMELHO, A.B. Marine Extremophiles: A Source of Hydrolases for Biotechnological Applications. **Mar Drugs**, v. 13, p. 1925-1965, 2015.

DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. **Biotechnology Research International**, p. 1-13, 2011.

DECEPTION ISLAND, SITE. 2016. Disponível em: <<http://www.deceptionisland.aq/>>. Acesso em: 13 jul 2016.

DIRUSSO, C.C. Primary sequence of the *Escherichia coli* *fadBA* operon, encoding the fatty acid-oxidizing multienzyme complex, indicates a high degree of homology to eucaryotic enzymes. **J Bacteriol.**, v. 172, p. 6459-6488, 1990.

DONG, H.; MUKAIYAMA, A.; TADOKORO, T.; KOGA, Y.; TAKANO, K.; KANAYA, S. Hydrophobic effect on the stability and folding of a hyperthermophilic protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 378, n. 1, p. 264-272, 2008.

DUARTE, R.T.D. **Micro-organismos em ambientes criogênicos: gelo glacial, solos expostos por recuo de geleiras, e permafrost polares.** 2010. 201f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FAERGEMAN, N.J.; DIRUSSO, C.C.; ELBERGER, A.; KNUDSEN, J.; BLACK, P.N. Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* homologue to the murine fatty acid transport protein impairs uptake and growth on long-chain fatty acids. **J Biol Chem.**, v. 272, n. 13, p. 8531-8538, 1997.

FELICIO, R.; OLIVEIRA, A.L.L.; DEBONSI, H.M. Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Cienc. Cult.**, v. 64, n. 3, 2012.

FERNÁNDEZ-GÓMEZ, B.; RICHTER, M.; SCHÜLER, M.; PINHASSI, J.; ACINAS, S.G.; GONZÁLEZ, J.M.; PEDRÓS-ALIÓ, C. Ecology of marine Bacteroidetes: A comparative genomics approach. **The ISME Journal**, v. 7, p. 1026-1037, 2013.

FERRER, M.; GUAZZARONI, M.E.; RICHTER, M.; GARCÍA-SALAMANCA, A.; YARZA, P.; SUÁREZ-SUÁREZ, A.; SOLANO, J.; ALCAIDE, M.; VAN DILLEWIJN, P.; MOLINA-HENARES, M.A.; LÓPEZ-CORTÉS, N.; AL-RAMAHI, Y.; GUERRERO, C.; ACOSTA, A.; DE EUGENIO, L.I.; MARTÍNEZ, V.; MARQUES, S.; ROJO, F.; SANTERO, E.; GENILLOUD, O.; PÉREZ-PÉREZ, J.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; RAMOS, J.L. Taxonomic and functional metagenomic profiling of the microbial community in the anoxic sediment of a sub-saline Shallow Lake (Laguna de Carrizo, Central Spain). **Microbial Ecology**, v. 62, n. 4, p. 824-837, 2011.

FERRER, M.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, M.; BARGIELA, R.; STREIT, W.R.; GOLYSHINA, O.V.; GOLYSHIN, P.N. Estimating the success of enzyme bioprospecting through metagenomics: current status and future trends. **Microb Biotechnol.**, v. 9, n. 1, p. 22-34, 2016.

FLORES, P.A.M.; CORREA-LLANTÉN, D.N.; BLAMEY, J.M. A thermophilic microorganism from Deception Island, Antarctica with a thermostable glutamate dehydrogenase activity. **Biol Res.**, v. 8, n. 51, p. 55, 2018.

FREIER, D.; MOTHERSHED, C.P.; WIEGEL, J. Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20. **Appl Environ Microbiol.**, v. 54, p. 204-211, 1988.

GANZERT, L.; LIPSKI, A.; HUBBERTEN, H.W.; WAGNER, D. The impact of different soil parameters on the community structure of dominant bacteria from nine different soils located on Livingston Island, South Shetland Archipelago, Antarctica. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 76, p. 476-491, 2011.

GILICHINSKY, D.A.; RIVKINA, E.; BAKERMANS, C.; SHCHERBAKOVA, V.; PETROVSKAYA, L.; OZERSKAYA, S.; IVANUSHKINA, N.; KOCHKINA, G.; LAURINAVICHUIS, K.; PECHERITSINA, S.; FATTAKHOVA, R.; TIEDJE, J. Biodiversity of cryopegs in permafrost. **FEMS Microbiol Ecol.**, v. 53, p. 117-128, 2005.

GOJGIC-CVIJOVIC, G.D.; MILIC, J.S.; SOLEVIC, T.M.; BESKOSKI, V.P.; ILIC, M. V.; DJOKIC, L.S.; NARANCIC, T.M.; VRVIC, M.M. Biodegradation of petroleum sludge and petroleum polluted soil by a bacterial consortium: a laboratory study. **Biodegradation**, v. 23, p. 1-14, 2012.

GUTIERREZ, T.; BANAT, I.M. **Isolation of glycoprotein bioemulsifiers produced by marine bacteria**. In: T. J. McGenity, K. N. Timmis, & B. Nogales (Eds.) *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols* (1 ed.). (Springer Protocols Handbooks). Springer, 2015.

GREER, C.W.; WHYTE, L.G.; NIEDERBERGER, T.D. **Microbial communities in hydrocarbon-contaminated temperate, tropical, alpine, and polar soils**. In: Timmis KN (eds) *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer: Berlin Heidelberg, 2010, pp. 2313-2328.

HEAD, I.M.; JONES, M.D.; RÖLING, W.F.M. Marine microorganisms make a meal of oil. **Nat Rev Microbiol.**, v. 4, n. 3, p. 173-182, 2006.

HERBOLD, C.W.; MCDONALD, I.R.; CARY, C. **Microbial ecology of geothermal habitats in Antarctica**. In: Cowan DA (ed) *Antarctic Terrestrial Microbiology: Physical and Biological Properties of Antarctic Soils*. Springer, New York, 2014. pp 181-215.

HORIKOSHI, K.; BULL, A.T. **Prologue: Definition, categories, distribution, origin and evolution, pioneering studies, and emerging fields of extremophiles**. In: Horikoshi K, Antranikaian G, Bull AT, Robb FT, Stetter, KO (eds) *Extremophiles Handbook*. Springer Tokyo, 2011, pp. 4–15.

HUBER, H.; STETTER, K. O. **Order II. Desulfurococcales ord. nov.** In: GARRITY, G.; BOONE, D.; CASTENHOLZ, R. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York, Springer, 2001. v. 1, p. 179-180.

HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G.W. Metagenomics. **Nature**, v. 455, p. 481-483, 2008.

HUR, S. D.; CUNDE, X.; HONG, S.; BARBANTE, C.; GABRIELLI, P.; LEE, K. Seasonal patterns of heavy metal deposition to the snow on Lambert Glacier basin, East Antarctica. **Atmospheric Environment**, v. 41, n. 38, p. 8567-8578, 2007.

JAIN, D.K.; COLLINS-THOMPSON, D.L.; LEE, H.; TREVORS, J.T. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 13, n. 4, p. 271-279, 1991.

JESUS, H.E.; PEIXOTO, R.S.; CURY, J.C.; VAN ELSAS, J.D.; ROSADO, A.S. Evaluation of soil bioremediation techniques in an aged diesel spill at the Antarctic Peninsula. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 99, p. 10815-10827, 2015a.

JESUS, H.E.; PEIXOTO, R.S.; ROSADO, A.S. Bioremediation in Antarctic Soils. **J Pet Environ Biotechnol.**, v. 6, n.6, 2015b.

JOSHI, N.; FASS, J. **Sickle**: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33), 2011.

JURELEVICIUS, D.; COTTA, S.R.; PEIXOTO, R.; ROSADO, A.S.; SELDIN, L. Distribution of alkane-degrading bacterial communities in soils from King George Island, Maritime Antarctic. **Eur J Soil Biol.**, v. 51, p. 37-44, 2012.

KAMANGAR, F.; CHOW, W.H.; ABNET, C.; DAWSEY, S. Environmental causes of esophageal cancer. **Gastroenterol Clin North Am.**, v. 38, n. 1, 2009.

KANG, D.D.; FROULA, J.; EGAN, R.; WANG, Z. MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities. **PeerJ.**, v. 3, p. 1165, 2015.

KARIGAR, C.S.; RAO, S.S. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-11, 2011.

KEEGAN, K.P.; GLASS, E.M.; MEYER, F. MG-RAST, a Metagenomics Service for Analysis of Microbial Community Structure and Function. **Methods Mol Biol.**, v. 1399, p. 207-233, 2016.

KIM, M.K.; HARWOOD, C.S. Regulation of benzoate-CoA ligase in *Rhodospseudomonas palustris*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 83, n. 2, p. 199-203, 1991.

KOLDZIUS, R.; GOJOBORI, T. Marine metagenomics as a source for bioprospecting. **Marine Genomics**, v. 14, n. 1, p. 21-30, 2015.

KUNIN, V.; COPELAND, A.; LAPIDUS, A.; MAVROMATIS, K.; HUGENHOLTZ, P. A bioinformatician's guide to metagenomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 4, p. 557-578, 2008.

KUSAKABE, M.; NAGAO, K.; OHBA, T.; HUN-SEO, J.; PARK, S.; LEE, J.; PARK, B. Noble gas and stable isotope geochemistry of the thermal fluids from Deception Island, Antarctica. **Antarct Sci.**, v. 21, p. 255–267, 2009.

KYLE, P.R. **McMurdo volcanic group-western Ross embayment: introduction.** In: W. LeMasurier, J. Thomson (Eds.), *Volcanoes of the Antarctic Plate and Southern*

Oceans. Antarctic Research Series, American Geophysical Union, Washington, D.C., 1990, pp. 18-25.

KYLE, P.R.; MOORE, J.A.; THIRLWALL, M.F. Petrologic evolution of anorthoclase phonolite lavas at Mount Erebus, Ross island, Antarctica. **Journal of Petrology**, v. 33, n. 4, p. 849-875, 1992.

KYRPIDES, N.C. et al. Genomic Encyclopedia of Bacteria and Archaea: Sequencing a Myriad of Type Strains. **PLoS Biology**, v. 12, n. 8, 2014.

LAMBRECHTS, S.; WILLEMS, A.; TAHON, G. Uncovering the Uncultivated Majority in Antarctic Soils: Toward a Synergistic Approach. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 242, 2019.

LANE, D. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. In: Stackebrandt, E.; Good Fellow, M. (eds.). 16S/23S rRNA sequencing. New York, John Wiley and Sons, 1991, pp. 115-175.

LEE, J.W.; KIM, T.Y.; JANG, Y.S.; CHOI, S.; LEE, S.Y. Systems metabolic engineering for chemicals and materials. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 370-378, 2011.

LIANG, Y.T.; VAN NOSTRAND, J.D.; DENG, Y.; HE, Z.L.; WU, L.Y.; ZHANG, X.; LI, G.H.; ZHOU, J.Z. Functional gene diversity of soil microbial communities from five oil-contaminated fields in China. **ISME J.**, v. 5, p. 403-413, 2011.

LLARCH, A.; LOGAN, N.; CASTELLVI, J.; PRIETO, M.; GUINEA, J. Isolation and characterization of thermophilic *Bacillus* spp. from geothermal environments on Deception Island, South Shetland Archipelago. **Microbial Ecol.**, v. 34, p. 58-65, 1997.

LOGAN, N.A.; LEBBE, L.; HOSTE, B.; GORIS, J.; FORSYTH, G.; HEYNDRIKX, M.; MURRAY, B.L.; SYME, N.; WYNN-WILLIAMS, D.D.; DE VOS, P. Aerobic endospore-forming bacteria from geothermal environments in northern Victoria Land, Antarctica, and Candlemas Island, South Sandwich archipelago, with the proposal of *Bacillus fumarioli* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 50, p. 1741-1753, 2000.

LOGAN, N.A.; ALLAN, R.N. **Aerobic, endospore-forming bacteria from Antarctic geothermal soils**. In: Dion P, Nautiyal CS (eds) Microbiology of extreme soil. Springer: Berlin, 2008. 155-175p.

LOPES, W.A.; ANDRADE, J.B. Fonte, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. **Química Nova**, v. 19, p. 497-516, 1996.

LYON, G.L. Stable isotope stratigraphy of ice cores and the age of the last eruption at Mt. Melbourne, Antarctica. N.Z.J. **Geol. Geophys.**, v. 29, p. 135-138, 1986.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; STAHL, D.; CLARK, D.P. **Aquatic environments**. Brock Biology of Microorganisms, 14th ed. Pearson Education, Inc., New Jersey, p. 683-697, 2016.

MAHIUDDIN, M.D.; FAKHRUDDIN, A.N.M.; MAHIN, A. Degradation of Phenol via Meta Cleavage Pathway by *Pseudomonas fluorescens* PU1. **ISRN Microbiology**, v. 2012, p. 1-6, 2012.

MAIER, R.M.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 5, p. 625-633, 2010.

MANDELLI, F.; MIRANDA, V.S.; RODRIGUES, E.; MERCADANTE, A.Z. Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. **World J Microbiol Biotechnol.**, v. 28, p. 1781-1790, 2012a.

MANDELLI, F.; YAMASHITA, F.; PEREIRA, J.L.; MERCADANTE, A.Z. Evaluation of biomass production, carotenoid level and antioxidant capacity produced by *Thermus filiformis* using fractional factorial design. **Braz J Microbiol.**, v. 43, n. 1, 2012b.

MANI, P.; SIVAKUMAR, P.; BALAN, S.S. Economic production and oil recovery efficiency of a lipopeptide biosurfactant from a novel marine bacterium *Bacillus simplex*. **Achiv. Life Sci.**, v. 10, p. 102-110, 2016.

MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends Biotechnol.**, v. 11, p. 558-565, 2012.

MARGESIN, R.; MITEVA, V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. **Research in microbiology**, v. 162, n. 3, p. 346-361, 2011.

MÁRQUEZ, S.L.; BLAMEY, J.M. Isolation and partial characterization of a new moderate thermophilic *Albidovulum* sp. SLM16 with transaminase activity from Deception Island, Antarctica. **Biol Res.**, v. 52, n. 1, p. 5, 2019.

MARTÍ, J.; GEYER, A.; AGUIRRE-DIAZ, G. Origin and evolution of the Deception Island caldera (South Shetland Islands, Antarctica). **Bulletin of Volcanology**, v. 75, p. 1-18, 2013.

MEDRANO-SANTILLANA, M.; SOUZA-BRITO, E.M.; DURAN, R.; GUTIERREZ-CORONA, F.; REYNA-LÓPEZ, G.E. Bacterial diversity in fumarole environments of the Parícutín volcano, Michoacán (Mexico). **Extremophiles**, v. 21, n. 3, p. 499-511, 2017.

MEHTA, R.; SINGHAL, P.; SINGH, H.; DAMLE, D.; SHARMA, A.K. Insight into thermophiles and their wide-spectrum applications. **3 Biotech.**, v. 6, n. 1, p. 81, 2016.

MENDEZ, C.; BRANA, A.F.; MANZANAL, M.B; HARDISSON, C. Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. **Can J Microbiol.**, v. 31, p. 446-450, 1985.

MEYER, F.; PAARMANN, D.; D'SOUZA, M.; OLSON, R.; GLASS, E.M.; KUBAL, M.; PACZIAN, T.; RODRIGUEZ, A.; STEVENS, R.; WILKE, A.; WILKENING, J.; EDWARDS, R.A. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 386, 2008.

MISHRA, V.K.; KIM, K. H.; HONG, S.; LEE, K. Aerosol composition and its sources at the King Sejong Station, Antarctic peninsula. **Atmospheric Environment**, v. 38, n. 24, p. 4069-4084, 2004.

MONCIARDINI, P.; IORIO, M.; MAFFIOLI, S.; SOSIO, M.; DONADIO, S. Discovering new bioactive molecules from microbial sources. **Microbial biotechnology**, v. 7, p. 209-220, 2014.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T.A study on the structure-function relationship of the lipopeptide biosurfactant. **Biochim Biophys Acta**, v. 1488, p. 211-218, 2000.

MUKHERJEE, S.; SESHADRI, R.; VARGHESE, N.J. et al. 1,003 reference genomes of bacterial and archaeal isolates expand coverage of the tree of life. **Nature Biotechnology**, v. 35, p. 676-683, 2017.

MULLIGAN, C.N.; COOPER, D.G.; NEUFELD, R.J. Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. **Journal of Fermentation Technology**, v. 62, n. 4, p. 311-314, 1984.

MUÑOZ, P.A.; FLORES, P.A.; BOEHMWALD, F.A. Thermophilic bacteria present in a sample from Fumarole Bay, Deception Island. **Antarct Sci.**, v. 23, p. 549-555, 2011.

MUÑOZ, P.; CORREA-LLANTÉN, D.; BLAMEY, J. Production, purification and partial characterization of four lipases from a thermophile isolated from Deception Island. **Lipids**, v. 48, p. 527-533, 2013.

MUÑOZ, P.; CORREA-LLANTÉN, D.; BLAMEY, J. Ionic Liquids Increase the Catalytic Efficiency of a Lipase (Lip1) From an Antarctic Thermophilic Bacterium. **Lipids**, v. 50, p. 49-55, 2015.

NATHAN, S.; SCHULTE, F.J. Recent thermal and volcanic activity on Mount Melbourne, northern Victoria Land, Antarctica. **New Zealand Journal of Geology and Geophysics**, v. 10, n. 2, p. 422-430, 1967.

NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v.170, p. 265-270, 1999.

NAZINA, T.N.; TOUROVA, T.P.; POLTARAUS, A.B.; NOVIKOVA, E.V.; GRIGORYAN, A.A.; IVANOVA, A.E.; LYSSENKO, A.M.; PETRUNYAKA, V.V.; OSIPOV, G.A.; BELYAEV, S.S.; IVANOV, M.V. Taxonomic study of aerobic thermophilic Bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*. **Intl J Syst Evol Microbiol.**, v. 51, p. 433-446, 2001.

NURK, S.; MELESHKO, D.; KOROBENNIKOV, A.; PEVZNER, P.A. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. **Genome Research**, v. 27, n. 5, p. 824-834, 2017.

NYSSÖNEN, M.; PISKONEN, R.; ITÄVAARA, M. Monitoring aromatic hydrocarbon biodegradation by functional marker genes. **Environmental Pollution**, v. 154, n. 2, p. 192-202, 2008.

NZILA, A. Current status of the degradation of aliphatic and aromatic petroleum hydrocarbons by thermophilic microbes and future perspectives. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 15, n. 12, p. 2782, 2018.

OLIVEIRA, E.R.; CARNICERO, D.; GARCÍA, B.; MIÑAMBRES, B.; MORENO, M.A.; et al. Two different pathways are involved in the β -oxidation of n-alkanoic and n-phenylalkanoic acids in *Pseudomonas putida* U: genetic studies and biotechnological applications. **Mol Microbiol.**, v. 39, n. 4, p. 863-874, 2001.

OMOKOKO, B.; JÄNTGES, U.K.; ZIMMERMANN, M.; REISS, M.; HARTMEIER, W. Isolation of the phe-operon from *G. stearothermophilus* comprising the phenol degradative meta-pathway genes and a novel transcriptional regulator. **BMC Microbiol.**, v. 8, p. 197, 2008.

ORHEIM, O.; GOVORUKHA, L.S. Present-day glaciations in the Shetland Islands. **Journal of Glaciology**, v. 3, p. 233-238, 1982.

PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G.A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S.S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 633-654, 2011.

PACYNA, J.M.; PACYNA, E.G. An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. **Environmental Reviews**, v. 9, n. 4, p. 269-298, 2001.

PALLÀS, R.; SMELLIE, J.L.; CASAS, J.M.; CALVET, J. Using tephrochronology to date temperate ice: correlation between ice tephras on Livingston Island and eruptive units on Deception Island volcano (South Shetland Islands, Antarctica). **The Holocene**, v. 11, n. 2, p. 149-160, 2001.

PANNEKENS, M.; KROLL, L.; MÜLLER, H.; MBOW, F.T.; MECKENSTOCK, R.U. Oil reservoirs, an exceptional habitat for microorganisms. **New Biotechnology**, v. 49, n. 25, p. 1-9, 2019.

PARK, C.; PARK, W. Survival and Energy Producing Strategies of Alkane Degraders Under Extreme Conditions and Their Biotechnological Potential. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-15, 2018.

PARKS, D.H.; IMELFORT, M.; SKENNERTON, C.T.; HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G.W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome Res.**, v. 25, v. 7, p. 1043-1055, 2015.

PARKS, D.H.; CHUVOCHINA, M.; WAITE, D.W.; CHRISTIAN, R.; SKARSHEWSKI, A.; CHAUMEIL, P.A.; HUGENHOLTZ, P. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. **Nature Biotechnology**, v. 36, p. 996-1004, 2018.

PEAT, H.J.; CLARKE, A.; CONVEY, P. Diversity and biogeography of the Antarctic flora. **J Biogeogr.**, v. 34, p. 132-146, 2007.

PEIXOTO, R.S.; CHAER, G.M.; CARMO, F.L.; ARAUJO, F.V.; PAES, J.E.; VOLPON, A.; SANTIAGO, G.A.; ROSADO, A.S. Bacterial communities reflect the spatial variation in pollutant levels in Brazilian mangrove sediments. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 9, p. 341-354, 2011.

PEREIRA, I.A.; RAMOS, A.R.; GREIN, F.; MARQUES, M.C.; DA SILVA, S.M.; VENCESLAU, S.S. A comparative genomic analysis of energy metabolism in sulfate reducing bacteria and archaea. **Frontiers on Microbiology**, v. 2, p. 88-109, 2011.

PÉREZ-PANTOJA, D.; DONOSO, R.; AGULLÓ, L.; CÓRDOVA, M.; SEEGER, M.; PIEPER, D.H.; GONZÁLEZ, B. Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in Burkholderiales. *Environ Microbiol.*, v. 14, n. 5, p. 1091-1117, 2012.

PERICARD, P.; DUFRESNE, Y.; COUDERC, L.; BLANQUART, S.; TOUZET, H. MATAM: reconstruction of phylogenetic marker genes from short sequencing reads in metagenomes. **Bioinformatics**, v. 34, n. 4, p. 585-591, 2018.

PHAM, V.H.; KIM, J. Cultivation of unculturable soil bacteria. **Trends Biotechnol.**, v. 30, p. 475-484, 2012.

PLANCHON, F.A.M.; BOUTRON, C.F.; BARBANTE, C.; COZZI, G.; GASPARI, V.; WOLFF, E.W.; FERRARI, CP.; CESCONE, P. Changes in heavy metals in antarctic snow from coastal land since the mid-19th to the late-20th century. **Earth and Planetary Science Letters**, v. 200, n. 1-2, p. 207-222, 2002.

PLANCKAERT, M. **Oil Reservoirs and Oil Production**. In: *Petroleum Microbiology*. B. Ollivier; M. Magot (ed.) 1st ed., Washington, ASM Press, 2005, pp. 1-20.

POWER, J.F.; CARERE, C.R.; LEE, C.K.; WAKERLEY, G.L.J.; EVANS, D.W.; BUTTON, M.; WHITE, D.; CLIMO, M.D.; HINZE, A.M.; MORGAN, X.C.; McDONALD, I.R.; CARY, S.C.; STOTT, M.B. Microbial biogeography of 925 geothermal springs in New Zealand. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 2876, 2018.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Res.**, v. 41, p. 590-596, 2013.

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. **Strategies for accessing soil metagenome for desired applications.** *Biotechnol Adv.*, v. 26, n. 6, p. 576-90, 2012.

RAMETTE, A.; TIEDJE, J.M.; BOETIUS, A. Impact of space, time and complex environments on microbial communities. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, p. 60-62, 2009.

RAMOS-BARBERO, M.D.; MARTÍNEZ, J.M.; ALMANSA, C.; RODRÍGUEZ, N.; VILLAMOR, J.; GOMARIZ, M.; ESCUDERO, C.; RUBIN, S.; ANTÓN, J.; MARTÍNEZ-GARCÍA, M.; AMILS, R. Prokaryotic and viral community structure in the singular chaotropic salt lake salar de uyuni. **Environ. Microbiol.**, v. 21, n. 6, p. 2029-2042, 2019.

RAMPELOTTO, P.H. **Biotechnology of extremophiles: Advances and challenges** (Grand Challenges in Biology and Biotechnology). New York, NY, Springer, 2016, pp. 720.

REYSENBACH, A.L.; BANTA, A.; BOONE, D.R.; CARY, C.; LUTHER, G. Microbial essentials at hydrothermal vents. **Nature**, v. 404, p. 835, 2000.

RICHARDSON, A.E.; SIMPSON, R.J. Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus. **Plant Physiol.**, v. 156, n. 3, p. 989-996, 2011.

ROJO, F. Degradation of alkanes by bacteria. **Environ Microbiol.**, v. 11, p. 2477-2490, 2009.

RUBERTO, L.; DIAS, R.; VAZQUEZ, S.; LOBALBO, A.; Mac CORMACK, W. Small-scale studies on biodegradation of hydrocarbons in acutely-contaminated Antarctic soils. **Reports on Polar and Marine Research**, v. 571, p. 340-347, 2008.

RUGGERI, C.; FRANZETTI, A.; BESTETTI, G.; CAREDDA, P.; LA COLLA, P.; PINTUS, M.; SERGI, S.; TAMBURINI, E. Isolation and characterisation of surface active compound-producing bacteria from hydrocarbon contaminated environments. **Int Biodeterior Biodegradation.**, v. 63, p. 936-942, 2009.

SANDREA, I.; SANDREA, R. Global oil reserves e recovery factors leave vast target for EOR technologies. **Oil Gas J.**, v. 105, p. 1-8, 2007.

SANGER, F.; AIR, G.M.; BARRELL, B.G.; BROWN, N.L.; COULSON, A.R.; FIDDES, J.C.; HUTCHISON III, C.A.; SLOCOMBE, P.M.; SMITH, M. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. **Nature**, v. 265, p. 687-695, 1977.

SANTOS, H.F.; CARMO, F.L.; PAES, J.E.S.; ROSADO, A.S.; PEIXOTO, R.S. Bioremediation of Mangroves Impacted by Petroleum. **Water, Air, Soil Pollut.**, v. 216, p. 329-350, 2010.

SANTOS, D.K.F.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 401, 2016.

SCHEDLER, M.; HIESSL, R.; JUAREZ, A.G.V.; GUST, G.; MULLER, R. Effect of high pressure on hydrocarbon-degrading bacteria. **AMB Express**, v. 4, p. 7-7, 2014.

SIEBER, C.M.K.; PROBST, A.J.; SHARRAR, A.; THOMAS, B.C.; HESS, M.; TRINGE, S.G.; BANFIELD, J.F. Recovery of genomes from metagenomes via a dereplication, aggregation and scoring strategy. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 7, p. 836-843, 2018.

SHINODA Y.; SAKAI Y.; UENISHI H.; UCHIHASHI Y.; HIRAISHI A.; YUKAWA H. et al. Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. strain DNT-1. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 1385-1392, 2004.

SHIVAJI, S.; REDDY, G.S.N.; CHATTOPADHYAY, M.K. Bacterial Biodiversity, Cold Adaptation and Biotechnological Importance of Bacteria Occurring in Antarctica. **Proc Indian Natn Sci Acad.**, v. 83, n. 2, p. 327-352, 2017.

SILIAKUS, M.F.; van der OOST, J.; KENGEN, S.W.M. Adaptations of archaeal and bacterial membranes to variations in temperature, pH and pressure. **Extremophiles**, v. 21, n. 4, p. 651-670, 2017.

SILVA, N.R.A.; LUNA, M.A., SANTIAGO, A.L.; FRANCO, L.O.; SILVA, G.K., DE SOUZA, P.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Biosurfactant-and-bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata* isolated from Caatinga soil in the northeast of Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, 2014.

SIMÕES, J.C.O. **Ambiente antártico: domínio de extremos**. In: Simões, J. C.; Garcia, C. A.E.; Evangelista, H.; Campos, L.S; Mata, M.M; Bremer, U.F. (Org.). *Antártica e as Mudanças Globais: um desafio para a humanidade*. São Paulo: Blucher, 2011. 15-27 p.

SINHA, R.K. et al. Diversity of retrievable heterotrophic bacteria in Kongsfjorden, an Arctic fjord. **Braz. J. Microbiol.**, v. 48, n. 1, p. 51-61, 2017.

SMELLIE, J.L.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, J. **Introduction**. In: López-Martínez, J., Smellie, J.L., Thomson, J.W., Thomson, M.R.A. (Eds.), *Geology and geomorphology of*

Deception Island. Cambridge, British Antarctic Survey, Natural Environmental Research Council, 2002. 1-6 p.

SNEHA, K.S.; PADMAPRIYA, B.; RAJESWARI, T. Isolation and screening of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* from oil spilled soils. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 11 n. 22, p. 321-325, 2012.

SMRITHI, S.; NARAYANAN, K.; RAO, V.J.; KAMATH, V.B. Bioprospecting of Microbes Producing Commercially Useful Products. **PHARMANEST - An International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 6, p. 1419-1426, 2013.

STRAUB, C.T.; ZELDES, B.M.; SCHUT, G.J.; ADAMS, M.W.W.; KELLY, R.M. Extremely thermophilic energy metabolisms: Biotechnological prospects. **Curr Opin Biotechnol.**, v. 45, p. 104-112, 2017.

STRAZZULLI, A.; FUSCO, S.; COBUCCI-PONZANO, B.; MORACCI, M.; CONTURSI, P. Metagenomics of microbial and viral life in terrestrial geothermal environments. **Rev Environ Sci Biotechnol.**, v. 16, p. 425, 2017.

STROUD, J.L.; PATON, G.I.; SEMPLÉ, K.T. Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation. **J Appl Microbiol.**, v. 102, n. 5, p. 1239-1253, 2007.

TAKETANI, R.G.; DOS SANTOS, H.F.; VAN ELSAS, J.D.; ROSADO, A.S. Characterisation of the effect of a simulated hydrocarbon spill on diazotrophs in mangrove sediment mesocosm. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, p. 343-54, 2009.

TATUSOVA, T.; DICUCCIO, M.; BADRETDIN, A.; CHETVERNIN, V.; NAWROCKI, EP.; ZASLAVSKY, L.; LOMSADZE, A.; PRUITT, K.D.; BORODOVSKY, M.; OSTELL, J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. **Nucleic Acids Res.**, v. 44, n. 14, p. 6614-6624, 2016.

TEIXEIRA, L.C.R.S.; PEIXOTO, R.S.; CURY, J.C.; SUL, W.J.; PELLIZARI, V.H.; TIEDJE, J.; ROSADO, A.S. Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica. **ISME J.**, v. 4, p. 989-1001, 2010.

TRINCONE, A. Review Marine Biocatalysts: Enzymatic Features and Applications. **Mar. Drugs**, v. 9, n. 4, p. 478-499, 2011.

THRONE-HOLST, M.; WENTZEL, A.; ELLINGSEN, T.E.; KOLTAR, H.K.; ZOTCHEY, S.B. Identification of novel genes involved in long-chain n-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. strain DSM 17874. **Appl Environ Microbiol.**, v. 73, n. 10, p. 3327-32, 2007.

TIN, T.; FLEMING, Z.L.; HUGHES, K.A.; AINLEY, D.G.; CONVEY, P.; MORENO, C.A.; PFEIFFER, S. Impacts of local human activities on the Antarctic environment. **Antarctic Science**, v. 21, p. 3-33, 2009.

TOBISZEWSKI, M.; NAMIEŚNIK, J. PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. **Environ Pollut.**, v. 162, p. 110-119, 2012.

TOUROVA, T.; SOKOLOVA, D.; SEMENOVA, E.M.; SHUMKOVA, E.S.; KORSHUNOVA, A.V.; BABICH, T.; POLTARAUS, A.B.; NAZINA, T. Detection of n-alkane biodegradation genes *alkB* and *ladA* in thermophilic hydrocarbon-oxidizing bacteria of the genera *Aeribacillus* and *Geobacillus*. **Microbiology**, v. 85, n. 6, p. 693-707, 2016.

UFARTÉ, L.; POTOCKI-VERONESE, G.; LAVILLE, E. Discovery of new protein families and functions: new challenges in functional metagenomics for biotechnologies and microbial ecology. **Front. Microbiol.**, v. 6, p. 563, 2015.

URITSKIY G.V.; DiRUGGIERO, J.; TAYLOR, J. MetaWRAP-a flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 158, 2018.

VALDERRAMA, J.A.; DURANTE-RODRÍGUEZ, G.; BLÁZQUEZ, B.; GARCÍA, J.L.; CARMONA, M.; DÍAZ, E. Bacterial degradation of benzoate: cross-regulation between aerobic and anaerobic pathways. **J. Biol. Chem.**, v. 287, p. 10494-10508, 2012.

VAN BEILEN, J.B.; FUNHOFF, E.G.; VAN LOON, A.; JUST, A.; KAYSSER, L.; BOUZA, M.; HOLTACKERS, R.; RÖTHLISBERGER, M.; LI, Z.; WITHOLT, B. Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases. **Appl Environ Microbiol.**, v. 72, n. 1, p. 59-65, 2006.

VAN DE VELDE, K. et al. Victoria Land Antarctica Pb and Ba concentrations and Pb isotope ratios. **Earth and Planetary Science Letters**, v. 232, p. 95-108, 2011.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 67, p. 503-549, 2003.

VAN WOLFEREN, M.; AJON, M.; DRIESSEN, A.J.; ALBERS, S.V. How hyperthermophiles adapt to change their lives: DNA exchange in extreme conditions. **Extremophiles**, v. 17, n. 4, p. 545-63, 2013.

VARJANI, S.J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresour. Technol.**, v. 223, p. 277-286, 2017.

VÁZQUEZ, S.; NOGALES, B.; RUBERTO, L.; HERNÁNDEZ, E.; CHRISTIE-OLEZA, J. Bacterial community dynamics during bioremediation of diesel oil-contaminated Antarctic soil. **Microb Ecol.**, v. 57, p. 598-610, 2009.

- VERDE, L.C.L. **Avaliação da diversidade filogenética e funcional da microbiota envolvida na biodegradação de hidrocarbonetos em amostras de petróleo de reservatórios brasileiros.** 2014. 146f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.
- VESTER, J.K.; GLARING, M.A.; STOUGAARD, P. Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments. **Extremophiles**, v. 19, n. 1, p. 17-29, 2015.
- VICKERS, C. **Investigating the Physiological and Metabolic Requirements of the Tramway Ridge Microbial Community, Mt Erebus, Antarctica.** 2012. (Tese de Doutorado). University of Waikato, Hamilton, New Zealand.
- WANG, W.; WANG, L.; SHAO, Z. Diversity and abundance of oil degrading bacteria and alkane hydroxylase (alkB) genes in the subtropical seawater of Xiamen Island. **Microb Ecol.**, v. 60, n. 2, p. 429-439, 2010.
- WARD, D.M.; WELLER, R.; BATESON, M.M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, v. 344, p. 63-65, 1990.
- WEI, Y.H.; CHOU, C.L.; CHANG, J.S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. **Biochem. Eng. J.**, v. 27: p. 146-154, 2005.
- WILKE, A.; HARRISON, T.; WILKENING, J.; FIELD, D.; GLASS, E.M.; KYRPIDES, N.; MAVROMMATIS, K.; MEYER, F. The M5nr: a novel non-redundant database containing protein sequences and annotations from multiple sources and associated tools. **BMC Bioinformatics**, v. 13, p. 141, 2012.
- WILKINS, L.G.E.; ETTINGER, C.L.; JOSPIN, G.; EISEN, J.A. Metagenome-assembled genomes provide new insight into the microbial diversity of two thermal pools in Kamchatka, Russia. **Scientific Reports**, v. 9, Article number: 3059, 2019.
- WÖRNER, G.; VIERECK, L. Subglacial to emergent volcanism at Shield Nunatak, Mt. Melbourne volcanic field. Antarctica. **Polar for schung**, v. 57, n. 1-2, p. 2741, 1987.
- WÖRMER, L.; HOSHINO, T.; BOWLES, M.W.; VIEHWEGER, B.; ADHIKARI, R.R.; XIAO, N.; URAMOTO, G.; KÖNNEKE, M.; LAZAR, C.S.; MORONO, Y.; INAGAKI, F.; HINRICHS, K.U. Microbial dormancy in the marine subsurface: Global endospore abundance and response to burial. **Science Advances**, v. 5, n. 2, p. 1-8, 2019.
- WU, C.Y.; TSAI, Y.P.; WU, M.Z.; TENG, S.C.; WU, K.J. Epigenetic reprogramming and post-transcriptional regulation during the epithelial-mesenchymal transition. **Trends Genet.**, v. 28, n. 9, p. 454-63, 2012.
- WU, Y.W.W.; SIMMONS, B.A.; SINGER, S.W. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 32, p. 605-607, 2015.

XU, Y.; LU, M. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. **J Hazard Mater**, v. 183, p. 395-401, 2010.

YARZA, P.; YILMAZ, P.; PRUESSE, E.; GLÖCKNER, F.O.; LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.H. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. **Nat Rev Microbiol.**, v. 12, p. 635-645, 2014.

YAN, P.; LU, M.; YANG, Q.; ZHANG, Z.Z.; CHEN, R. Oil recovery from refinery oily sludge using a rhamnolipid biosurfactant-producing *Pseudomonas*. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 24-28, 2012.

YAO, N.; REN, Y.; WANG, W. Genome Sequence of a Thermophilic Bacillus, *Geobacillus thermodenitrificans* DSM465. **Genome Announc.**, 1:e01046-13, 2013.

YERGEAU, E.; NEWSHAM, K.K.; PEARCE, D.A.; KOWALCHUK, G.A. Patterns of bacterial diversity across a range of Antarctic terrestrial habitats. **Environ Microbiol.**, v. 9, p. 2670-2682, 2007.

YERGEAU, E.; LAWRENCE, J.R.; SANSCHAGRIN, S.; WAISER, M.J.; KORBER, D. R.; GREER, C.W. Next-generation sequencing of microbial communities in the Athabasca River and its tributaries in relation to oil sands mining activities. **Appl Environ Microbiol.**, v. 78, p. 7626-7637, 2012.

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

ZAIKOVA, E.; GOERLITZ, D.S.; TIGHE S.W.; WAGNERN.Y.; BA, Y.; HALL B.L.; BEVILACQUA, J.G.; WENG M.M.; SAMUELS-FAIR, M.D.; JOHNSON, S.S. Antarctic Relic Microbial Mat Community Revealed by Metagenomics and metatranscriptomics. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 7, p. 1-22, 2019.

ZHANG, C.; KIM, S.K. Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects. **Mar Drugs.**, v. 8, n. 6, p. 1920-1934, 2010.

ZHENG, C.; HE, J.; WANG, Y.; WANG, M.; HUANG, Z. Hydrocarbon degradation and bioemulsifier production by thermophilic *Geobacillus palidus* strains. **Bioresour Technol.**, v.102, n.19, p. 9155-61, 2011.

ZOBELL, C. Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. **J Mar Res.**, v. 4, p. 42-75, 1941.

9 ANEXOS

9.1 ARTIGOS E CAPÍTULOS DE LIVRO PUBLICADOS/ACEITOS DURANTE O DOUTORADO



GENOME SEQUENCES



Draft Genome Sequence of *Brevibacillus* sp. Strain LEMMJ03, Isolated from an Antarctic Volcano

Júnia Schultz,^a René Kallies,^b Ulisses Nunes da Rocha,^b Alexandre Soares Rosado^{a,c}

^aLaboratory of Molecular Microbial Ecology, Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^bDepartment of Environmental Microbiology, Helmholtz Centre for Environmental Research—UFZ, Leipzig, Germany

^cDepartment of Land, Air, and Water Resources, University of California—Davis, Davis, California, USA

ABSTRACT Here, we announce the draft genome sequence of *Brevibacillus* sp. strain LEMMJ03, isolated from Whalers Bay sediment (Deception Island, Antarctica). In total, 4,500 coding sequences (CDS), among those 102 coding for tRNAs and 5 for noncoding RNAs (ncRNAs), were predicted from the 4.64-Mb genome. Predicted functions were for bacteriocin and degradation of aromatic compounds.

Members of the genus *Brevibacillus* (phylum *Firmicutes*) are rod-shaped, Gram-positive, spore-forming, mostly strict aerobes with ubiquitous distribution in soils, including those of Antarctica (1, 2).

Geothermal habitats in Antarctica typically consist of heated mineral soils found near fumarolic vents and are exclusively associated with geologically active volcanoes, such as Deception Island, a marine polar volcano with temperatures ranging from 0 to 120°C and gradients of salinity and geochemistry (2, 3). These unique characteristics make the thermophiles of Antarctica an untapped resource for bioprospecting new enzymes, cosmetic products, and other biotechnological applications (4, 5).

Brevibacillus sp. strain LEMMJ03 was isolated from a thermophilic sediment (50°C) collected near a fumarole vent in Whalers Bay (62°58'788"S, 60°33'464"W), Deception Island, Antarctica. Briefly, the sediment (500 g) was collected (depth, 0 to 5 cm), placed in a sterile plastic bag, and stored at 4°C. For bacterial isolation, the sample was homogenized, and 10 g was added to 90 ml of saline (0.85% NaCl) in a flask with glass beads and kept stirring at 2 × g for 2 h. Serial 10-fold dilutions were prepared, in which 0.1 ml of each dilution was spread over *Bacillus schlegelii* heterotrophic medium (DSMZ 260) plates and incubated at 55°C for 48 h.

A single colony was isolated, and genomic DNA extraction was performed using a Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI, USA) and quantified using a Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). For the genome sequencing on an Illumina MiSeq platform, a NEBNext Ultra II FS DNA library kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) was used to prepare a paired-end 301-bp library, following the manufacturer's instructions. Sickle (6), with a Phred quality score of >30, was used for the quality control and to trim the sequences. *De novo* assembly was performed using SPAdes (7), and CheckM and RefineM (8) were used for the quality check and to provide completeness and contamination information. Annotation was carried out with the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) (9) and on the Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) server (10). Default parameters were used for all software.

The draft assembly of *Brevibacillus* sp. LEMMJ03 resulted in a length of 4,646,831 bp with 53× coverage, 98.49% completeness, 1.51% contamination, 142 contigs, and a GC content of 58.7%. Annotation by PGAP predicted, in total, 102 tRNA genes, 5 noncoding RNA (ncRNA) genes, 34 rRNA genes, and 4,500 coding sequences (CDS). The annotation

Citation Schultz J, Kallies R, Nunes da Rocha U, Rosado AS. 2019. Draft genome sequence of *Brevibacillus* sp. strain LEMMJ03, isolated from an Antarctic volcano. *Microbiol Resour Announc* 8:e00921-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00921-19>.

Editor Christina A. Cuomo, Broad Institute

Copyright © 2019 Schultz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Alexandre Soares Rosado, arosado@micro.ufrr.br.

Received 6 August 2019

Accepted 9 September 2019

Published 3 October 2019



Draft Genome Sequence of *Geobacillus* sp. Strain LEMMJ02, a Thermophile Isolated from Deception Island, an Active Volcano in Antarctica

Júnia Schultz,^a René Kallies,^b Ulisses Nunes da Rocha,^b Alexandre Soares Rosado^{a,c}

^aLaboratory of Molecular Microbial Ecology, Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^bDepartment of Environmental Microbiology, Helmholtz Centre for Environmental Research-UFZ, Leipzig, Germany

^cDepartment of Land, Air, and Water Resources, University of California—Davis, Davis, California, USA

ABSTRACT The thermophilic *Geobacillus* sp. strain LEMMJ02 was isolated from Fumarole Bay sediment on Deception Island, an active Antarctic volcano. Here, we report the draft genome of LEMMJ02, which consists of 3,160,938 bp with 52.8% GC content and 3,523 protein-coding genes.

The genus *Geobacillus* is a member of the phylum *Firmicutes*, consisting of Gram-positive, aerobic or facultative anaerobic, heterotrophic, and obligatory thermophilic bacteria (1). It was identified in different thermophilic habitats, such as hot springs, volcanoes, and manmade thermophilic biotopes (2, 3). *Geobacillus* species can have biotechnological importance, mainly bioremediation, second-generation biofuel, and enzyme production (4, 5).

Here, we present the draft genome sequence of *Geobacillus* sp. strain LEMMJ02, isolated from Antarctic volcano sediment collected near a fumarole (500 g of sediment from 0 to 5 cm deep; environmental temperature, 100°C) in Fumarole Bay, Deception Island (62°58'2.7"S; 60°42'36.4"W). The sediment sample was homogenized, and 10 g was added to 90 ml of saline solution (0.85%) with glass beads and agitated for 2 h. Serial 10-fold dilutions (from 10⁻¹ to 10⁻⁹) were prepared in the same diluent, and 0.1 ml of each dilution was spread over glucose yeast malt medium plates (6).

After incubation at 55°C for 48 h, a single colony was used for genomic DNA extraction with a Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Madison, USA), and the DNA was then quantified using a Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). A NEBNext Ultra II FS DNA library kit (New England Biolabs, Ipswich, USA) was used to prepare a paired-end 300-bp library, which was sequenced on an Illumina MiSeq system. Sequences were quality checked and trimmed with Sickle (Phred quality score, >30) (7) and assembled with SPAdes (8). The assembled scaffolds were quality checked with CheckM and RefineM (9), and the coding DNA sequences (CDSs) were predicted and annotated using the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) tool (10) and the Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) server (11). Default settings were used for all software.

The assembly of *Geobacillus* sp. LEMMJ02 resulted in 433 contigs with a total length of 3,436,274 bp and a coverage of 36×. The completeness, obtained by CheckM and RefineM, was 98.91%, with 0.0% contamination and 52.8% GC content. In total, based on the PGAP results, 3,799 genes were predicted, including 3,523 protein-coding genes, 84 tRNA genes, 29 rRNA genes, 5 noncoding RNA genes, and 158 pseudogenes, as well as 3 CRISPR arrays. Genes coding for terpenoid biosynthesis and aromatic degradation of fluorene, naphthalene, and anthracene were predicted from the genome using RAST. Genes related to the production of secondary metabolites were detected with antiSMASH (12), highlighting the presence of fengycin (an antifungal

Citation Schultz J, Kallies R, Nunes da Rocha U, Rosado AS. 2019. Draft genome sequence of *Geobacillus* sp. strain LEMMJ02, a thermophile isolated from Deception Island, an active volcano in Antarctica. *Microbiol Resour Announc* 8:e00920-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00920-19>.

Editor Christina A. Cuomo, Broad Institute

Copyright © 2019 Schultz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Alexandre Soares Rosado, arosado@micro.ufjf.br.

Received 6 August 2019

Accepted 30 September 2019

Published 17 October 2019



Draft Genome Sequence of *Microbacterium* sp. Strain LEMMJ01, Isolated from Antarctic Ornithogenic Soil

Júnia Schultz,^a Yuri Alves Pinheiro de Souza,^a
Maria Cristina Pinheiro Pereira Reis Mansur,^b Alane Beatriz Vermelho,^b
Fábio Faria da Mota,^c Alexandre Soares Rosado^a

Laboratory of Molecular Microbial Ecology, Microbiology Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; Bloinovar Laboratory, Microbiology Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

ABSTRACT We report here the 3,637,012-bp draft genome sequence of *Microbacterium* sp. strain LEMMJ01, isolated from ornithogenic soil from King George Island, Antarctica. The total number of genes presented in the draft genome sequence was 3,553, and the total number of coding sequences was 3,497. In addition, genes related to the production of terpene and carotenoids were revealed.

The genus *Microbacterium* is a member of the phylum *Actinobacteria*, a Gram-positive, aerobic, and heterotrophic bacterium (1, 2). It is found in different habitats, having been described in sponges, deep-sea sediments, humans, and polar environments (3–6). *Microbacterium* species have biotechnological importance, such as in biosurfactant production, bioremediation (7), and the application of their natural pigments, such as carotenoids, in the food, cosmetics, textiles, and pharmaceutical industries (8, 9).

We sequenced the draft genome sequence of *Microbacterium* sp. strain LEMMJ01, isolated from Antarctic ornithogenic soil collected close to the Arctowsky Polish Station near an Adelie penguin nest (62°09' 790"S; 58°27' 687"W) in Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. The soil processing protocol was described in a previous work (10), and single colonies of the psychrophilic bacteria were isolated on LB medium after growing at 12°C for 48 h. The isolated colonies were then grown in liquid LB medium (12°C for 48 h), and their genomic DNA was extracted using the FastDNA SPIN kit for soil (MoBio) and quantified using a Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific). The Nextera XT DNA library kit was used to build paired-end 250-bp libraries, which were sequenced on an Illumina MiSeq. Assembly was performed by MR DNA (Shallowater, TX) using NGen version 12 from DNASTar, and the coding DNA sequences (CDSs) were predicted and annotated using two tools, the NCBI Prokaryotic Genome Automatic Annotation Pipeline (PGAAP) and the Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) server (11).

The draft assembly of *Microbacterium* sp. LEMMJ01 resulted in 3,637,012 bp, with 300× coverage and 70.20% GC content, present in 44 contigs, with an N_{50} of 335,663 bp. The total number of genes presented in the draft genome sequences was 3,553, and the total number of coding sequences was 3,497. In addition, 46 tRNAs and 56 rRNAs were predicted in the complete genome.

The results revealed, by PGAAP, that carotenoid biosynthesis genes were localized as a cluster that included genes encoding C50 carotenoid epsilon cyclases. Genes related to the production of terpenes were detected with antiSMASH (12), highlighting the biotechnological interest in this strain. The presence of resistance genes was verified by ResFinder 2.1 (13), with no positive results. Further analyses will be carried

Received 25 May 2017 Accepted 30 May 2017 Published 20 July 2017

Citation Schultz J, de Souza YAP, Mansur MCP, Vermelho AB, da Mota FF, Rosado AS. 2017. Draft genome sequence of *Microbacterium* sp. strain LEMMJ01, isolated from Antarctic ornithogenic soil. *Genome Announc* 5:e00672-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00672-17>.

Copyright © 2017 Schultz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Alexandre Soares Rosado, arosado@micro.ufrj.br.



1 **REVIEW – Extremophiles Journal - Accepted**

2

3

4 **Extreme environments: A source of biosurfactants for biotechnological applications**

5

6

7 **Júnia Schultz and Alexandre Soares Rosado***

8

9 Laboratory of Molecular Microbial Ecology, Institute of Microbiology Paulo de Góes, Federal University of Rio
10 de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

11

12

13 ***Corresponding author**

14

15 Alexandre Soares Rosado

16 Institute of Microbiology Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ)

17 Av. Carlos Chagas Filho, 373, CCS, Bloco E Subsolo, Ilha do Fundão, 21941-902, Rio de Janeiro, Brazil

18 Telephone: +55 21 2560-8028

19 e-mail: asrosado@micro.ufrj.br

OPEN Carotenoids from UV-resistant Antarctic *Microbacterium* sp. LEMMJ01

Received: 21 February 2019
Accepted: 14 June 2019
Published online: 02 July 2019

Maria Cristina P. P. Reis-Mansur¹, Janine S. Cardoso-Rurr², Josemar V. Maiworm Abreu Silva³, Gabriela Rodrigues de Souza⁴, Verônica da Silva Cardoso⁵, Felipe Raposo Passos Mansoldo¹, Yuri Pinheiro⁵, Júnia Schultz⁵, Luciene B. Lopez Balottin³, Antonio Jorge Ribeiro da Silva⁴, Cláudia Lage², Elisabete Pereira dos Santos⁶, Alexandre Soares Rosado⁵ & Alane Beatriz Vermelho¹

The *Microbacterium* sp. LEMMJ01 isolated from Antarctic soil does not belong to any of the nearest species identified in the RDP database. Under UV radiation (A, B and C wavebands) the survival fractions of *Microbacterium* sp. cells were much higher compared with wild-type *E. coli* K12A15. Especially remarkable for an Antarctic bacterium, an expressive resistance against high UV-B doses was observed. The increased survival of DNA repair-proficient *E. coli* grown overnight added of 0.1 mg/ml or 1 mg/ml of the whole pigment extract produced by *Microbacterium* sp. revealed that part of the resistance of *Microbacterium* sp. against UV-B radiation seems to be connected with photoprotection by its pigments. Scanning electron microscopy revealed that UV-A and UV-B ensued membrane alterations only in *E. coli*. The APCI-MS fingerprints revealed the diagnostic ions for neurosporene (m/z 580, 566, 522, 538, and 524) synergism for the first time in this bacterium by HPLC-MS/MS analysis. Carotenoids also were devoid of phototoxicity and cytotoxicity effects in mouse cells and in human keratinocytes and fibroblasts.

Carotenoids are natural pigments that exhibit many biological functions including antioxidant effects. New sources of antioxidant substances and solar protectors have been the target of worldwide research in cosmetology. The Antarctic Continent is an extreme environment and has a very different microbial biodiversity due to its hostile ecosystems. Numerous pigments produced by microorganisms resistant to ultraviolet radiation (UV) have been found on this continent. Bacteria isolated from Antarctica possess mechanisms to protect themselves from the harsh environmental conditions. Possibly they harbor increased synthesis of photoprotective pigments such as carotenoids, due to the high levels of local radiation. Also, the photoprotective pigments help stabilize membrane structure during growth under low temperatures¹.

Solar UV radiation causes distinct types of damage: UV-A radiation (400–315 nm) leads to indirect damage to cellular DNA, proteins, and lipids by generating intracellular chemical intermediates such as reactive oxygen species (ROS). This type of UV radiation causes mutagenesis in eukaryotic cells, photoageing and other skin disorders². In contrast, UV-B (315–280 nm) radiation causes direct DNA damage by inducing the generation of DNA photoproducts, such as cyclobutane pyrimidine dimers and the pyrimidine-pyrimidone photoadducts. These rays have been termed as "burning" or "erythema" rays since they are primarily responsible for the redness associated with sunburn, erythema and skin cancer³. The most energetic rays are the UV-C (280–100 nm) wavelengths, under which the main absorption of nucleic acids peaks; however, the ozone layer efficiently filters these

¹BIOINOVAR - Biocatalysis, Bioproducts and Bioenergy, Paulo de Góes Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil. ²LaRBio - Radiations and Biology Laboratory, Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil. ³Labio/Dimav/Inmetro - Laboratory of Tissue Bioengineering/Directorate of Metrology Applied to Life Sciences/National Institute of Metrology, Quality and Technology, Duque de Caxias, Brazil. ⁴Research Institute for Natural Products, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil. ⁵LEMM - Laboratory of Microbial Molecular Ecology, Paulo de Góes Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil. ⁶Faculty of Pharmacy, Galenico Development Laboratory, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.B.V. (email: abvermelho@micro.ufrj.br)

Artigo Técnico

Tratabilidade do lodo biológico têxtil e produção de biogás em reator UASB em diferentes temperaturas

Textile biological sludge treatability and biogas production in UASB reactor under different temperatures

Júnia Schultz¹, Adilson Pinheiro², Joel Dias da Silva³

RESUMO

Neste trabalho avaliou-se o comportamento de um reator UASB em escala laboratorial (16 L) no tratamento de lodo biológico têxtil com produção de biogás, operando em diferentes temperaturas, 35 (mesofílica), 45 e 55°C (termofílica), com tempo de detenção hidráulica (TDH) constante de 24 h. O reator UASB apresentou-se apto a tratar o lodo têxtil, sendo influenciado positivamente pelo incremento da temperatura, mostrando maiores remoções nas temperaturas termofílicas e com altas taxas de remoção de todos os parâmetros físico-químicos monitorados: demanda química de oxigênio (DQO) (97% em 45 e 55°C), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (95% em 45°C e 94% em 55°C), fósforo total (P-total) (95% a 45 e 55°C) e nitrogênio total (N-total) (94% a 45 e 55°C). Quanto à produção de biogás e à concentração de metano, os maiores valores foram observados a 45°C. Com base nos resultados alcançados, confirmam-se a tratabilidade do lodo têxtil e a produção de biogás em UASB, com melhor performance a 45°C.

Palavras-chave: lodo têxtil, digestão anaeróbia, reator UASB, biogás.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the behavior of a laboratory-scale UASB reactor (16 L) in the treatment of textile biological sludge with biogas production, operating at different temperatures – 35 (mesophilic), 45 and 55°C (thermophilic) –, with constant hydraulic retention time of 24 h. The UASB reactor was able to treat the textile sludge, being positively influenced by increasing temperature, with greater removals in thermophilic temperatures and high removal rates of all monitored physical and chemical parameters: chemical oxygen demand (COD) (97% at 45 and 55°C), biochemical oxygen demand (BOD) (95% at 45°C and 94% at 55°C), total phosphorus (P-total) (95% at 45 and 55°C) and total nitrogen (N-total) (94% at 45 and 55°C). As for biogas production and methane concentration, the highest values were observed at 45°C. Based on the results, textile sludge treatability and biogas production in UASB are confirmed, with best performance at 45°C.

Keywords: textile sludge, anaerobic digestion, UASB reactor, biogas.

INTRODUÇÃO

O processo natural de decomposição da matéria orgânica na ausência de oxigênio, também conhecido como digestão anaeróbia, ocorre em vários estágios bioquímicos consecutivos, dos quais participam diferentes micro-organismos (GARCIA, 2011). Produtos intermediários como ácidos graxos, acetatos, gases, entre outros, são continuamente gerados e processados ao longo da decomposição (PEREIRA; CAMPOS; MOTERANI, 2009).

Em sistemas fechados e controlados, como biodigestores (FERNANDES *et al.*, 2014), reatores de leito fluidizado (MOTTERAN *et al.*, 2014),

reatores operando em batelada (PINTO *et al.*, 2014), reatores anaeróbios de fluxo ascendente e manta de lodo (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket* – UASB) (SCHNEIDERS *et al.*, 2013), o processo sofre a influência de fatores como potencial hidrogeniônico (pH), cargas tóxicas e nutrientes (ASSUNÇÃO; VON SPERLING, 2012; PEREIRA; CAMPOS; MOTTERAN, 2013). Diferentes temperaturas também podem afetar o processo, positiva ou negativamente (KIM *et al.*, 2012; RAMAKRISHNAN; SURAMPALLI, 2012).

Dos fatores citados, a temperatura destaca-se por estar diretamente relacionada com o processo de sobrevivência, crescimento e

¹Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Biotecnologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) – Rio de Janeiro (RJ), Brasil.

²Doutor em Física e Química Ambiental. Professor do Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental no Centro de Ciências Tecnológicas da Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB) – Blumenau (SC), Brasil.

³Doutor em Engenharia Ambiental e Sanitária. Professor do Departamento de Engenharia de Produção e Design e do Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental no Centro de Ciências Tecnológicas da FURB – Blumenau (SC), Brasil.

Endereço para correspondência: Júnia Schultz – Avenida Carlos Chagas Filho, 373 – Ilha do Fundão – 20940-902 – Rio de Janeiro (RJ), Brasil – E-mail: juniaschultz@gmail.com

Recebido em: 21/01/2015 – Aceito em: 06/01/2017 – Reg. ABES: 145106

Estudos de impacto ambiental: potencialidades, deficiências e perspectivas de elaboradores e avaliadores

Environmental impact assessment: potentials, deficiencies and prospects from developers and evaluators

Chaiane Schoen*

Júnia Schultz^b

Kássia Heinz^c

Suelen Cristina Grott^d

Adilson Pinheiro*

*Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da
Universidade Regional de Blumenau (Furb), Blumenau, SC, Brasil
End. Eletrônico: chaiane.schoen@gmail.com

^bDoutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos da
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil
End. Eletrônico: juniaschultz@gmail.com

^cDoutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da
Universidade Regional de Blumenau (Furb), Blumenau, SC, Brasil
End. Eletrônico: kassiaagh@gmail.com

^dMestre em Engenharia Ambiental pela Universidade Regional de Blumenau (Furb),
Blumenau, SC, Brasil
End. Eletrônico: suelengtt@bol.com.br

*Professor do Departamento de Engenharia Civil e do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental
da Fundação Universidade Regional de Blumenau (Furb), Blumenau, SC, Brasil
End. Eletrônico: pinheiro@furb.br

doi:10.18472/SustDeb.v7n2.2016.17644

Recebido em 04.02.2016

Aceito em 23.05.2016

ARTIGO - VARIA

RESUMO

O estudo de impacto ambiental (EIA), apesar de constituir instrumento fundamental para a tomada de decisão sobre a implantação e operação de empreendimentos potencialmente causadores de impactos negativos no ambiente, apresenta desafios para consolidá-lo como ferramenta de desenvolvimento sustentável. Diante disso, este estudo teve o objetivo de avaliar EIA disponíveis em plataforma digital federal e estadual quanto ao desenvolvimento baseado em legislação reguladora e entender a pers-



Júnia Schultz and Alexandre Soares Rosado

3 Use of microbes from extreme environments for biotechnological applications

3.1 Introduction

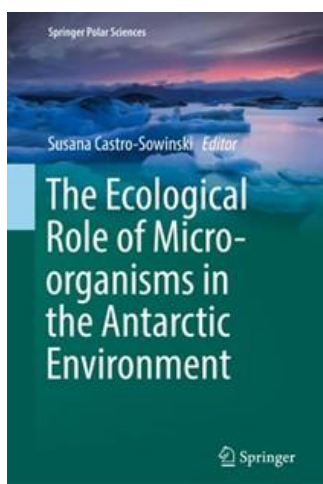
Recent years have seen the discovery of many organisms that are capable of inhabiting extreme environments considered lethal to humans and other forms of life, increasingly expanding the known limits of living beings [1] (Fig. 3.1). These organisms are called extremophiles, and they not only tolerate environmental extremes but also require these conditions for optimal growth and development [2, 3]. Extremophiles are members of all three domains of life, but include mainly prokaryotic organisms, i.e. Bacteria and Archaea, and a few eukaryotes such as microalgae, fungi, and protozoa, which also possess adaptations to certain extreme environmental conditions [3, 4].

Extremophiles are classified according to the physical and chemical conditions in their habitats: (1) psychrophilic, thermophilic, and hyperthermophilic, which grow under conditions of very low, high, and very high temperatures, respectively



Fig. 3.1: Different extreme environments present around the Earth, such as cold environments in Antarctica and Arctic, hot springs in California, USA, and geothermal sites in New Zealand, where extremophiles can be found. Source: Authors.

<https://doi.org/10.1515/9783110525786-003>



Chapter 12

Microbial Role in the Ecology of Antarctic Plants



Júnia Schultz and Alexandre Soares Rosado

Abstract Antarctica is a true mosaic of extremes. It is a continent of superlatives, with low temperatures, freezing and thawing cycles, high salinity and intense solar radiation, among other environmental extremes. These unique conditions exert evolutionary pressure, which selects the biological community to develop in place, such as the microbial community. Ice-free soils represent a very small proportion of the total land area of Antarctica, and in these areas, a scarce Antarctic vegetation grows. The vegetation of these ice-free habitats is characterized by low coverage and low productivity, being mainly composed of lower plants, with only two vascular plant species, *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis*. Climate change in Antarctica may present new threats to terrestrial ecosystems particularly by increasing the distribution of the native plants but also increasing the successful establishment of non-native species. It is known that the vegetation cover has an important role in the microbial diversity of Antarctic soils due that these microorganisms produce molecules that cooperate with the establishment and development of plants in harsh conditions and vice versa. Our chapter selects and discusses some of the few studies that describe microbe-plant interactions in Antarctica and how these interactions can modulate the distribution, diversity and abundance of native vascular plants and microbial diversity in Antarctica.

Keywords Rhizospheric microbes · *Deschampsia antarctica* · *Colobanthus quitensis* · Microbial diversity · Development of plants

J. Schultz · A. S. Rosado (✉)
Laboratory of Molecular Microbial Ecology, Institute of Microbiology Paulo de Góes,
Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
e-mail: asrosado@micro.ufrj.br

© Springer Nature Switzerland AG 2019
S. Castro-Sowinski (ed.), *The Ecological Role of Micro-organisms
in the Antarctic Environment*, Springer Polar Sciences,
https://doi.org/10.1007/978-3-030-02786-5_12

257



POLUIÇÃO MARINHA
 Pesq. Júlia Schultz, Msc. Doutoranda em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

A poluição marinha é proveniente de uma rede complexa de resíduos oriundos das atividades industriais, agrícolas, turísticas, comerciais e residenciais. Imensas quantidades de plástico, poluentes orgânicos, metais pesados, óleo, energia, resíduos radioativos e altas cargas de nutrientes são lançadas diariamente no oceano, e estas se caracterizam como as principais fontes de contaminação (Cham et al., 2008; Brown, Takeda, 2017).

Na literatura pertinente, observase que o grande vilão da deterioração da saúde dos ecossistemas oceânicos, atualmente são os plásticos (Boucher, Frrot, 2017). Estes são polímeros sintéticos, que contém substâncias químicas tóxicas, particularmente duráveis. Essas substâncias são difíceis de serem degradadas e impactam os oceanos, principalmente, pelas enormes ilhas de "lixo", como o relatado por Bryant et al. (2016), de uma área no Pacífico estimada em mais de 1 milhão de quilômetros quadrados de superfície e com cerca de 10 metros de profundidade, onde foram registradas consequências fatais a inúmeros organismos marinhos.

Os plásticos, ao serem transformados por ações físicas das ondas, salinidade dos oceanos e radiação solar, originam os micropásticos, pequenos fragmentos que podem ser observados a olho nu ou serem partículas de 20 micros de diâmetro, ou seja, mais finos que o cabelo humano (Galloway et al., 2017). Estes micropásticos fazem a água parecer turva e são mais facilmente ingeridos pela vida marinha, especialmente por organismos filtradores, que filtram a água do mar e acumulam essas partículas não só no estômago, mas também em seus tecidos e fluidos (Wagner et al., 2012). Estes compostos entram na cadeia alimentar e podem atingir aos humanos, pelo consumo dessas animais amarelenadas, e causar impactos potenciais para a saúde, como alteração hormonal (Wright et al., 2013; Rochman et al., 2016).

A poluição por óleo é considerada a mais rápida e impactante, justamente por ser uma das formas mais visíveis de danos à saúde do meio marinho, especialmente quando ocorrem catástrofes petrolíferas. Um exemplo foi o incidente no Golfo do México, que ocorreu em 2010 e derramou 5 milhões de barris de petróleo no oceano, devido à exploração de uma



plataforma da British Petroleum, causando um dano ambiental calculado em mais de 17 bilhões de dólares (Dishup et al., 2017). Entretanto, essas catástrofes representam apenas cerca de 10% da poluição global por óleo no contexto marinho.

Grande parte do óleo que polui o mar é resultante de fontes difusas, como o tráfego de petroleiros, vazamentos durante a extração de petróleo, operações de limpeza de tanques ilegais no mar ou descargas nos rios, que são então levados ao mar, componentes valiosos do óleo originados pela química e que entram em contato com a água, que diariamente são lançados no ambiente (Beach et al., 2010).

Porém, seja por fonte difusa ou catástrofe ambiental, o impacto do petróleo é perturbador, uma vez que subleia a vida marinha até a morte, especialmente a barreira de corais, que são animais extremamente sensíveis à poluição e possuem uma regeneração lenta ao impacto ambiental. Com a perda da biodiversidade dos corais, que é um dos principais provedores de serviços ambientais, há perda de qualidade da saúde dos oceanos (Turner, Renegar, 2017). Cita-se, ainda, como efeito a quebra do isolamento térmico para aqueles animais que sobrevivem, posto que conduzem a mudanças comportamentais da fauna e alteram de forma brutal todo o ecossistema afetado, seja em superfície, ou em profundidade.

Tudo o aporte desses contaminantes citados e muitos outros gerados pela ação humana ao ambiente marinho vem sendo alvo de constantes e ríspidas pesquisas por parte da comunidade científica que, apesar desse conhecimento disponibilizado à população pela mídia, redes sociais, veículos científicos e organizações Não-Governamentais de cunho ambiental, a poluição marinha está se agravando, especialmente pelo consumo desenfreado pela sociedade, falta de tratamento adequado e, ainda, pela falta de informação.



9.2 PRODUTIVIDADE ACADÊMICA DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO

9.2.1 Produções em qualidade de primeira autora referentes à tese de doutorado

1. **Schultz, Júnia** and Rosado, Alexandre Soares. "Use of microbes from extreme environments for biotechnological applications". Capítulo de livro em *Advanced Techniques for Studying Microorganisms in Extreme Environments* (De Gruyter), editado por Dr. Etienne Yergeau. **Publicado**, 2019.
2. **Schultz, Júnia** and Rosado, Alexandre Soares. "Extreme environments: A source of biosurfactant for biotechnological applications". *Extremophiles Journal*. **Aceito**, 2019.
3. **Schultz, Júnia**; Kallies, René; da Rocha, Ulisses Nunes; Rosado, Alexandre Soares. "Draft-genome Sequence of *Geobacillus* sp. strain LEMMJ02, a thermophile isolated from an Antarctic volcano". *Microbiology Resource Announcements*. **Publicado**, 2019.
4. **Schultz, Júnia**; Kallies, René; da Rocha, Ulisses Nunes; Rosado, Alexandre Soares. "Draft-genome Sequence of *Brevibacillus* sp. strain LEMMJ03 isolated from an Antarctic volcano sediment". *Microbiology Resource Announcements*. **Publicado**, 2019.
5. **Schultz, Júnia**; Vilaridi, Isabella Campelo Argentino; Kallies, René; da Rocha, Ulisses Nunes; Rosado, Alexandre Soares. "Polyphasic analysis reveals petroleum hydrocarbon degradation and biosurfactant production of non-dominant thermophilic bacteria from Deception Island, an Antarctic volcano". *Systematic and Applied Microbiology*. **A ser submetido**, 2019.
6. **Schultz, Júnia**; Toscan, Rodolfo; Kallies, René; Bendia, Amanda Gonçalves, Pellizari, Vivian Helena; Rosado, Alexandre Soares; da Rocha, Ulisses Nunes. "Comparative metagenomics of volcanic environments". **Em preparação**, 2019.

7. **Schultz, Júnia**; Raghavendra, Anil; Rosado, Alexandre Soares; Dennis, Paul G. “Amplicon-metagenomic analysis of microbial communities (16S, 18S and ITS) from Deception Island volcano”. **Em preparação**, 2019.

9.2.2 Produções não relacionadas à tese

1. Mansur, M.C.P.P.R.; Cardoso-Rurr, J.; Silva, J.; Souza, G.R.; Cardoso, V.S.; Mansoldo, F.; De Souza, Y.A.P. ; **Schultz, J.**; Lage, C.; Balottin, L.L.; Silva, A.R.; Santos, E.P.; **Rosado, A.S.**; Vermelho, A.B. Novel carotenoids from UV-resistant Antarctic *Microbacterium* sp. LEMMJ01. Scientific Reports. **Publicado**, 2019.
2. **Schultz, Júnia** and Rosado, Alexandre Soares. “Microbial role in the ecology of Antarctic plants”. Capítulo de livro em *The Ecological Role of Microorganisms in the Antarctic Environment* (Springer Polar Sciences), editado por Susana Castro-Sowinski. **Publicado**, 2019.
3. **Schultz** et al. “Tratabilidade do lodo biológico e produção de biogás em reator UASB em diferentes temperaturas”. Engenharia Sanitária e Ambiental. **Publicado**, 2018.
4. **Schultz** et al. “Draft Genome Sequence of *Microbacterium* sp. Strain LEMMJ01, Isolated from Antarctic Ornithogenic Soil”. Genome announcements. **Publicado**, 2017.
5. **Schultz, Júnia**. “Poluição marinha”. Capítulo de livro em *12 Feridas Ambientais do Planeta* (HB Editora), editado por Joel Dias da Silva e Gustavo Siqueira. **Publicado**, 2017.
6. **Schultz** et al. “Estudos de Impacto Ambiental: potencialidades, deficiências e perspectivas de elaboradores e avaliadores”. Sustentabilidade em Debate. **Publicado**, 2016.

7. **Schultz, Júnia; Corrêa, Felipe Borin** et al. “Community shift of a mixed culture during benzene degradation under nitrate reduction conditions”. **Em preparação**, 2019.

9.2.3 Prêmios e bolsas recebidas

1. 2015. Bolsa CNPq de Doutorado – Ingressa em primeiro lugar no Doutorado do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos (PBV-UFRJ);
2. 2017. Um dos 6 doutorandos brasileiros selecionados para receber o prêmio *Australia – Brazil PhD Exchange Award*, oferecido pela Academia de Ciências Australiana e Embaixada da Austrália no Brasil. A estudante passou dois meses na *University of Queensland*, em Brisbane, Austrália, no laboratório do Prof. Dr. Paul Dennis.
3. 2017. Uma das selecionadas no âmbito mundial para receber o prêmio de mobilidade *Bourse de mobilité internationale – France* oferecida pela *Université Bretagne Occidentale*. A estudante passou três meses no laboratório do Prof. Dr. Mohamed Jebbar, em Plouzané, França.
4. 2018. Bolsa CAPES PDSE – A estudante foi agraciada com uma bolsa de doutorado sanduíche com duração de 6 meses na *Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung UFZ*, em Leipzig, Alemanha.
5. 2019. Prêmio de viagem para o I Congresso de Ecologia Microbiana – América Latina (*I International Symposium on Microbial Ecology Latin America – ISME LA*), oferecido pelo ISME, realizado em Valparaíso, Chile.

9.2.4 Apresentações e participações em eventos científicos

1. I International Symposium on Microbial Ecology – Latin America. Participação em Evento Internacional (Chile) e apresentação de trabalho intitulado

- “Exploring thermophiles from an Antarctic volcano for potential application in oil industry” – 2019;
2. Australia Alumni Leadership Conference. Participação em Evento Internacional (Brasil) – 2019;
 3. Doc Seminar, UMB, Helmholtz. Apresentação Oral em Evento Regional (Alemanha) com apresentação intitulada “Thermophilic communities from an Antarctic volcano: Potentials for bioprospection” – 2018;
 4. 17th International Symposium on Microbial Ecology. Participação em Evento Internacional (Alemanha) – 2018;
 5. I BMMO Workshop. Participação em Evento Internacional (Alemanha) – 2018;
 6. XV Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental – ENAMA. Participação em Evento Nacional (Brasil) e apresentação de trabalhos intitulados “Isolation of thermophilic bacteria from polar geothermal sites of Antarctica” e “Oil degrading bacteria from Antarctic active volcano” – 2017;
 7. 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Participação em Evento Nacional (Brasil) – 2017;
 8. XLI Semana Acadêmica de Biologia da Universidade Regional de Blumenau. Palestra em Evento Regional (Brasil), intitulada “Microrganismos da Antártica: entre o fogo e o gelo - A vida microbiana de um vulcão antártico” – 2017;
 9. I AquaRio Workshop on Marine Microbiome Diversity and Manipulation. Participação em Evento Internacional (Brasil) – 2017;
 10. I Congresso de Astrobiologia. Participação em Evento Nacional (Brasil) – 2017;
 11. Australia-Brazil PhD Exchange debrief session. Apresentação Oral em Evento Internacional (Austrália) – 2017;

12. Workshops at Science at the Shine Dome. Participação em Evento Internacional (Austrália) – 2017;
13. Workshop de Bioinformática. Participação em Evento Nacional (Brasil) – 2017;
14. Australia Alumni Leadership Conference – Participação em Evento Internacional (Brasil) e apresentação de trabalho intitulado “Bioprospecting of thermophilic microorganisms and its application in the bioremediation of oil contaminated environments on Deception Island, Antarctica” – 2017;
15. II Encontro de Astrobiologia NUPESC. Participação em Evento Nacional (Brasil) – 2016;
16. I Simpósio em Biotecnologia Ambiental. Participação em Evento Nacional (Brasil) – 2016;
17. IV Encontro de Ciências do Universo. Participação em Evento Nacional (Brasil) – 2016.

9.2.5 Co-orientações e participação de banca examinadora

1. Co-orientação de estudante de intercâmbio (Colômbia) Beatriz Vivian Paredes Contreras. Em andamento, 2019.
2. Co-orientação de trabalho de conclusão de curso (Ciências Biológicas – Microbiologia e Imunologia) de Isabella Campelo Vilardi Argentino. Finalizado, 2017.
3. Co-orientação de estudante de iniciação científica Isabella Campelo Vilardi Argentino. Finalizado, 2016-2017.
4. Participação em banca examinadora de Bruna Gomes dos Santos. Peptidases de extremófilos: obtenção, produção e aplicação industrial. Trabalho de

Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2016.

9.2.6 Outras atividades

1. Curadora da Coleção de Bactérias Antárticas do Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LEMM/UFRJ) durante os quatro anos de Doutorado (2015 a 2019).
2. Participação da Comissão Organizadora do evento científico “3º Encontro de Biotecnologia e Bioprocessos UFRJ” (2019).
3. Menção honrosa na XXIV Semana de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, realizado entre os dias 15 e 19 de outubro de 2018, com o trabalho "Bioprospecção de substâncias antimicrobianas em isolados psicotolerantes e termotolerantes da região Antártica", apresentado por Sarah Mederos da Silveira e tendo como co-autores: João Ricardo Vidal Amaral, Felipe da Silva Diniz, Sheila da Silva, Júnia Schultz, Alexandre Soares Rosado, Andrew Macrae e Selma Soares de Oliveira.
4. Representação discente da PBV durante os anos de 2016/2017. Durante esse período, a aluna foi co-responsável pela criação da página do Facebook da PBV, pelo grupo de WhatsApp dos alunos do PBV e pela criação da disciplina semestral em forma de workshop com presença obrigatória, otimizada pelo Professor Andrew Macrae.