



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO CIÊNCIAS DO MAR
MESTRADO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

LUÍNA BENEVIDES LIMA

FREQUÊNCIA DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOSURFACTANTES
LIPOPEPTÍDEOS EM SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS DO CEARÁ

FORTALEZA - CEARÁ

2013

LUÍNA BENEVIDES LIMA

FREQUÊNCIA DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOSURFACTANTES
LIPOPEPTÍDEOS EM SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS DO CEARÁ

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vânia Maria Maciel Melo

FORTALEZA-CEARÁ

2013

LUÍNA BENEVIDES LIMA

FREQUÊNCIA DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BISSURFACTANTES
LIPOPETÍDEOS EM SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS DO CEARÁ

Dissertação submetida à
Coordenação do Curso de Pós-Graduação em
Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de
Ciências do Mar da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre.

Aprovada em ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Vânia Maria Maciel Melo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^a Dra. Maria Valderez Ponte Rocha
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dra. Vanessa Lúcia Rodrigues Nogueira
Universidade Federal do Ceará - UFC

Aos meus pais, Paulo e Selma,
E à minha irmã, Joyce.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem Ele nada seria possível.

À família que Ele me deu, especialmente meu pai, Paulo, minha mãe, Selma, e minha irmã, Joyce, que sempre estiveram ao meu lado tanto na vida acadêmica, quanto na vida pessoal. Aos meus primos, que cresceram junto comigo e foram sempre presentes, e que considero verdadeiros irmãos.

À minha orientadora Vânia Melo, pelo exemplo de professora, pela dedicação no ensino e por me acompanhar desde o início da minha vida acadêmica.

À professora Luciana Rocha, pelo apoio e disponibilização do tensiômetro do seu laboratório, que foi fundamental para o desenvolvimento desse trabalho. Também à sua aluna Darlane, pela ajuda com as cromatografias realizadas nesse trabalho.

Aos amigos do Lembiotech (Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia), Alysson Lira, Vanessa Nogueira, Lidianne Leal, Denise Hissa, Júlio Ximenes, Geórgia Colares, Tallita Tavares, Walderly Melgaço, Samantha Costa, Hortência Barroso, Luis Henrique, Leonardo Normando, Sasha Gabrielle, Natália Falcão, Bárbara Cibelle, Laís Feitosa, Vanessa Câmara, Camila Tauane, Lyanderson Aquino e Jean Michel. Agradeço também aos que já passaram pelo laboratório durante os cinco anos que estive no Lembiotech: Raphaela Gomes, Técia Carvalho, Caio Leão, Elisângela Alencar, Glauber Melo, Natasha Wanderley, Lilian Pâmela, Tatiana Bomfim, Kizeane Farjado e Gustavo Amaral. A todos vocês, o meu sincero obrigado pela agradável convivência diária e pelo aprendizado que me proporcionaram entre conversas, seminários e congressos. Um especial obrigado à Melissa Sanders, que foi fundamental para a conclusão desse trabalho, por ter trabalhado comigo durante todo o seu desenvolvimento e ter se tornado uma verdadeira amiga para mim.

Um especial obrigado também aos amigos Felipe Ribeiro e Hilton Galvão, que estiveram presentes desde os estudos para entrar no mestrado até o final do curso. Agradeço pela amizade sincera, pelo apoio e por sempre alegrarem meus dias.

Ao seu Valdenor, que torna possível o trabalho de todos no bloco 909, sempre de bom humor, cuidando da limpeza e da ordem dos laboratórios.

Ao Instituto de Ciências do Mar – Labomar, com todos os professores do curso, que contribuíram para a minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Ceará e ao Departamento de Biologia, que possibilitaram o desenvolvimento do projeto.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, ajudaram na execução desse trabalho.

“Não é o que você faz, mas quanto amor você dedica no que faz que realmente importa.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Biossurfactantes são moléculas de caráter anfipático, que apresentam características tensoativas importantes para os organismos produtores. Esses compostos apresentam um vasto campo de aplicação industrial, havendo uma contínua busca por novas moléculas. Ambientes de alta diversidade e ainda pouco estudados, como os manguezais, representam fontes promissoras de micro-organismos produtores desses metabólitos. Nesse trabalho, amostras de sedimentos de dois manguezais do Ceará, Timonha e Icapuí, foram utilizadas para o isolamento de bactérias produtoras de biossurfactantes, com o intuito de verificar a frequência desses compostos em sedimentos de manguezais e uma possível correlação com o grau de impactação do ambiente. Amostras de sedimentos foram aquecidas a 60 °C por 1 h, para promover a seleção de bactérias produtoras de esporos, conhecidas por produzirem biossurfactantes. Ao final do processo de isolamento foram selecionados 200 isolados que foram cultivados em Caldo Surfactina a 30 °C por 48 h. As culturas foram então centrifugadas, para separar o sobrenadante das células, que foram lavadas e eluídas em água destilada. O estudo da produção de biossurfactantes envolveu ensaios de emulsificação (E24), determinação da redução da tensão superficial, pesquisa dos genes para surfactina e iturina, capacidade de dispersão de óleo e determinação da concentração de biossurfactantes. Dos 100 isolados provenientes do manguezal de Timonha, 28 produziram índices de emulsificação acima de 50%, contra 18 dos 100 isolados do manguezal de Icapuí. O gene para surfactina (*sfp*) foi detectado em 7 isolados de Timonha e em 11 de Icapuí, enquanto os genes para iturina (*ituD* e *lpa14*) foram detectados em 5 isolados de Timonha e em 5 de Icapuí. Também foram encontrados isolados capazes de promover emulsificação e de reduzir a tensão superficial, que não carregavam os genes para surfactina e iturina, sugerindo a produção de outros tensoativos. Treze isolados se destacaram pela excelente capacidade de dispersar óleo derramado em água. Não se observou nenhuma correlação entre o grau de impactação dos manguezais estudados com a produção de biossurfactantes. Os resultados obtidos nesse trabalho revelam o grande potencial existente na microbiota dos manguezais para a produção de surfactantes lipopeptídicos e sugerem um papel intrínseco desses compostos nas populações produtoras.

Palavras-chave: Biossurfactantes, manguezal, sedimento, emulsificação, dispersão de óleo.

ABSTRACT

Biosurfactants are surface-active molecules with amphipathic character and natural origin, with an important physiological role for the producing organisms. These compounds have a wide range of industrial applications and there is a continuous search for new molecules. High diversity environments and still poorly understood, such as mangroves, represent promising sources of those metabolites producers. In this study, sediment samples from Timonha and Icapuí mangroves were used for the isolation of biosurfactant producing bacteria. The samples were heated at 60 °C/1 h to promote selection of spore-producing bacteria, which comprises the genus *Bacillus*, known to produce biosurfactants. Then, 200 microorganisms were selected and studied for biosurfactant production by cultivation in Surfactin Broth at 30 °C for 48 h. The cultures were centrifuged to separate the supernatant of cells, which were washed and eluted with distilled water. The screening for biosurfactant producing bacteria was performed using the emulsification test (E24) with the cells and supernatants, medium's surface tension reduction, search for genes related to the production of surfactin and iturin, dispersant activities and productivity. From the hundred isolated from mangrove Timonha, 28 had emulsification index above 50% with the supernatants, and only 6 had good rates with cells. In Icapuí mangrove, 18 isolates had good rates with the supernatants, and only 4 with cells. No difference can be attributed to the different impact degrees of mangroves. The genes studied were found as follows: *sfp* - present in seven isolates from Timonha, and eleven from Icapuí; *ituD* and *lpa14*- detected in five isolates from Timonha and five from Icapuí. Bacteria with good results in E24 and surface tension reduction, but negative for the genes tested may consist of sources of new biomolecules. Thirteen isolates showed excellent oil dispersant activity, with formation of halos with the maximum size allowed by the petri dish. The present results show the great potential existing in mangroves microbiota for the production of surfactants lipopeptide and suggest an intrinsic role of these compounds in producing populations.

Keywords: Biosurfactants, mangrove, sediment, emulsification, oil dispersion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Distribuição dos manguezais no mundo.....	3
FIGURA 2 – Mecanismo de ação da atividade dispersante, mostrando sua localização na interface água/óleo (1) e a formação de gotículas de óleo (2).....	8
FIGURA 3 – Imagens de satélite mostrando os pontos de coleta de sedimentos nos manguezais de Timonha (A) e Icapuí (B).....	18
FIGURA 4 – Número de isolados produtores de emulsificação versus percentual de emulsificação.....	24
FIGURA 5 – Número de isolados produtores de emulsificantes versus percentual de emulsificação	25
FIGURA 6 – Número de isolados versus percentual de redução da tensão superficial do caldo surfactina produzida por biossurfactantes produzidos por isolados de bactérias provenientes de sedimentos dos manguezais de Timonha e Icapuí.....	27
FIGURA 7 – Potencialidades dos isolados provenientes dos manguezais de Timonha e Icapuí para emulsificação e redução da tensão superficial estudados.....	28
FIGURA 8 – Eletroforese em gel de agarose (1%) mostrando os isolados positivos de Timonha (A) e de Icapuí (B), para o gene <i>sfp</i> . C ⁺ - Controle positivo, <i>B. subtilis</i> LAMI008; B – Branco da reação.....	30
FIGURA 9 – Eletroforese em gel de agarose (1%) mostrando os isolados positivos de Timonha (A) e de Icapuí (B), para os genes <i>ituD</i> e <i>lpa14</i> . C ⁺ - Controle positivo, <i>Bacillus</i> sp. 255 ; B – Branco da reação.....	31
FIGURA 10 – Taxas de ocorrência dos genes <i>sfp</i> e <i>ituD</i> e <i>lpa14</i> nos 200 isolados selecionados dos manguezais do Timonha e Icapuí.....	32
FIGURA 11a – Dispersão de óleo produzida por culturas de isolados bacterianos selecionados a partir de sedimentos dos manguezais do Timonha e Icapuí, agrupados de acordo com a presença do gene para surfactina (<i>sfp</i>).....	35
FIGURA 11b – Dispersão de óleo produzida por culturas de isolados bacterianos selecionados a partir de sedimentos dos manguezais do Timonha e Icapuí, agrupados de acordo com a presença dos genes para iturina conjuntamente (<i>ituD</i> e <i>lpa14</i>) ou para apenas um dos dois genes, <i>ituD</i> ou <i>lpa14</i>	36
FIGURA 12 – Concentração de biossurfactantes produzidos pelas culturas de bactérias que apresentaram a presença de pelo menos um dos genes pesquisados.....	38

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Principais biossurfactantes e micro-organismos produtores.....	9
TABELA 2 – Micro-organismos produtores de lipopeptídeos e suas respectivas atividades..	12
TABELA 3 – Resumo das atividades tensoativas e da presença dos genes.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APP	Área de Preservação Permanente
AS	Ágar Sabouraud
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC	Concentração Micelar Crítica
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
E24	Ensaio de emulsificação com 24 horas
ORF	Janela de Leitura Aberta (<i>Open Reading Frame</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH	Potencial Hidrogeniônico
<i>rpm</i>	Rotações por minuto
SAC	Compostos Ativos de Superfície (<i>Surface Active Compounds</i>)
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)

SUMÁRIO

1	Introdução	1
2	Revisão Bibliográfica	3
2.1	Manguezais	3
2.2	Ecologia dos manguezais.....	5
2.3	Biossurfactantes	7
2.3.1	Lipopeptídeos.....	11
2.4	Métodos de seleção de micro-organismos produtores de biossurfactantes	13
3	Objetivos.....	16
3.1	Objetivos gerais.....	16
3.2	Hipótese	16
4	Materiais e métodos.....	17
4.1	Áreas de coleta.....	17
4.2	Método de coleta.....	17
4.3	Isolamento e cultivo dos micro-organismos	18
4.4	Seleção das linhagens isoladas para a produção de biossurfactantes.....	19
4.4.1	Ensaio de emulsificação	19
4.4.2	Tensão superficial	20
4.4.3	Pesquisa de genes de lipopeptídeos.....	20
4.5	Teste da dispersão do óleo	21
4.6	Extração dos biossurfactantes produzidos pela linhagens promissoras	22
4.7	Determinação da concentração do biossurfactantes.....	22
5	Resultados e Discussão.....	23
5.1	Isolamento e seleção das bactérias produtoras de biossurfactantes	23
5.2	Reação de PCR para os genes <i>sfp</i> , <i>ituD</i> e <i>lpa14</i>	30
5.3	Atividade dispersante do óleo com as linhagens promissoras.....	34
5.4	Concentração da produção de biossurfactante com as linhagens promissoras	38
6	Conclusão	40
7	Referências Bibliográficas.....	41
8	Apêndices	48

1 Introdução

Os manguezais constituem um dos mais importantes ecossistemas costeiros das regiões tropicais e subtropicais e apresentam importante papel ecológico global. São ambientes caracterizados por apresentarem alta produtividade, por terem papel de berçário para a reprodução de diversos animais e por serem detentores de uma vasta diversidade microbiana, principal contribuinte para a ciclagem dos nutrientes. Esses ecossistemas são caracterizados pela alta complexidade, apresentando espécies vegetais adaptadas às condições peculiares desses ambientes, que incluem sedimentos lamosos e anóxicos que estão submetidos a variações ambientais decorrentes do fluxo das marés (DIAS, 2008; KATHIRESAN & SANDILYAN, 2012).

Os manguezais também são conhecidos pelo elevado grau de resiliência, o que é possível graças à diversidade de organismos e de metabólitos produzidos pelos mesmos. Por se localizarem em áreas de transição entre os ambientes marinho e o terrestre, esses ambientes estão naturalmente expostos a contaminantes provenientes das águas oceânicas e continentais.

A recuperação de sedimentos contaminados com substratos hidrofóbicos é acelerada na presença de compostos anfipáticos, como os surfactantes (ALONGI, 2008). Surfactantes consistem em moléculas de caráter anfipático, ou seja, com uma fração polar e outra apolar, que são capazes de aumentar a interação entre duas fases de diferentes polaridades. As características físico-químicas que definem os surfactantes são as suas habilidades de aumentar a solubilidade de compostos hidrofóbicos em água, de formar emulsões com hidrocarbonetos e de reduzir as tensões superficial e interfacial. Quando essas moléculas apresentam origem microbiana, são denominadas biossurfactantes e, por terem origem natural, apresentam diversas vantagens frente aos surfactantes sintéticos, como menor toxicidade, maior biodegradabilidade e maior estabilidade em condições adversas.

A capacidade de produção desses compostos, também traz uma série de vantagens para o micro-organismo produtor, destacando-se a capacidade de tornar substratos hidrofóbicos mais biodisponíveis. Alguns biossurfactantes também demonstram atividade antimicrobiana, o que é importante nas interações ecológicas naturais e parecem envolvidos na formação de biofilmes (CHANDRASEKAR, SORIAL & WEAVER, 2006; PACWA- PŁOCINICZAK *et al*, 2011).

Os lipopeptídeos constituem uma classe de biossurfactantes bastante diversificada, tanto pelos seus compostos, quanto pelos os micro-organismos produtores. Contudo, o gênero *Bacillus* se destaca por ser o responsável pela produção de boa parte dos

lipopeptídeos conhecidos atualmente. Em geral, biossurfactantes produzidos por *Bacillus* apresentam boa redução de tensão superficial, baixa Concentração Micelar Crítica (CMC) e baixa atividade emulsificante (RON & ROSENBERG, 2001; RAMKRISHNA, 2010).

Atualmente, já são conhecidos lipopeptídeos com atividades antimicrobianas, citostáticas, antitumorais, inibidores de enzimas, dispersantes de óleos, dentre outras. Entretanto, não há um surfactante que, sozinho, detenha todas as atividades mencionadas. Dessa maneira, é de grande importância a contínua busca por novos micro-organismos produtores, que levem à descoberta de novos metabólitos (RAMKRISHNA, 2010).

Considerando a vasta diversidade microbiana, ecossistemas ainda pouco explorados como os manguezais, despontam como uma valiosa fonte de novos micro-organismos e biomoléculas. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo isolar bactérias nativas de dois manguezais do Ceará e avaliar o potencial dessas linhagens para a produção de biossurfactantes.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Manguezais

Os manguezais são ecossistemas costeiros de alta produtividade, situados em regiões tropicais e semi-tropicais. Apresentam características particulares como sedimentos lodosos, pouco oxigenados, inundados periodicamente pelas marés, o que levou a seleção de espécies adaptadas a viverem nessas condições (DIAS, 2008; KATHIRESAN & SANDILYAN, 2012).

A distribuição dos manguezais ocorre em 123 países, estando limitada às latitudes 30° Norte e 30° Sul, ocorrendo comumente em regiões costeiras úmidas e estuários (Figura 1). Estudos apontam que os manguezais têm papel fundamental no sequestro de carbono da atmosfera, chegando a ser responsável por aproximadamente 22,8 milhões de toneladas de carbono a cada ano. Apesar de cobrirem apenas 0,1% da superfície terrestre do planeta, as florestas de mangue são responsáveis por cerca de 11% da entrada total de carbono terrestre no oceano e 10% do carbono orgânico terrestre dissolvido exportado para o oceano (SPALDING, KAINUMA & COLLINGS, 2010; GIRI *et al*, 2011; KATHIRESAN & SANDILYAN, 2012).



Figura 1 - Distribuição dos manguezais no mundo (GIRI *et al*, 2011).

O Brasil apresenta uma área de 13.000 km² de manguezal, o que o torna o segundo país com a maior área desse ecossistema. A distribuição de manguezais no país ocorre de forma quase contínua, iniciando no extremo norte no Oiapoque, no Estado do Amapá, se estendendo até Santa Catarina. Apenas no Estado do Rio Grande do Sul não ocorre à

vegetação característica dos manguezais (SPALDING, KAINUMA & COLLINGS, 2010; GIRI *et al*, 2011).

Os manguezais apresentam grande importância geológica, pois sua vegetação característica contribui para a manutenção da linha de costa, protegendo o ecossistema contra a erosão provocada pelo hidrodinamismo das marés. Têm também elevado valor ecológico, decorrente do seu papel de berçário para a reprodução de diversas espécies de animais, além de, por ser um ambiente com altos teores de matéria orgânica, abrigar uma vasta diversidade microbiana que atua na ciclagem desses materiais, participando direta e ativamente no ciclo geoquímico de diversos elementos. Além desses fatores, o ecossistema manguezal tem importante papel social, devido à sua riqueza natural, e serve de fonte de alimento para as comunidades que vivem em seu entorno (SCHAEFFER-NOVELLI, 1990; DIAS, 2008; KRUITWAGEN *et al*, 2010).

Dada sua importância, os manguezais são considerados áreas de preservação permanente em todo o território nacional, de acordo com a Lei do Código Florestal Brasileiro e da Resolução 303/2002 do Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA, de forma que a sua ocupação só é permitida para fins de utilidade pública (BRASIL, 1965; BRASIL, 2002).

Apesar do valor ecológico, geológico e social, estudos de monitoramento das áreas de manguezais revelaram que entre os anos de 1980 e 2005, 35.600 km² de manguezal foram perdidos no mundo. Apesar do ritmo de degradação das áreas de manguezais ter diminuído essas taxas ainda são consideradas altas quando comparadas aos índices de perda de outras florestas de distribuição global. A perda do ecossistema decorre principalmente de atividades como a aquicultura, agricultura e urbanização descontrolada (SPALDING, KAINUMA & COLLINGS, 2010).

No Estado do Ceará, os manguezais ocupam cerca de 23.000 hectares, mas muito dessa área vem sendo perdida e contaminada, como consequência da atividade antrópica. Estudos recentes apontam que dentre os impactos observados nos manguezais do Ceará cerca de 60,3% são decorrentes do desmatamento, 27,6% do aterro, 6,9% da exploração mineral e 5,2% da deposição de lixo (SILVA & SOUZA, 2006). Em vista da constante perda de área dos manguezais do Ceará, torna-se necessário a criação de novas Unidades de Conservação no restante dos estuários do Estado, bem como o desenvolvimento de estudos nesses ambientes, tanto de monitoramento, quando de bioprospecção, de forma a compreender melhor o seu funcionamento e biodiversidade (SILVA & SOUZA, 2006).

2.2 Ecologia dos manguezais

Os manguezais apresentam uma grande diversidade em sua fauna devido à sua localização, sendo habitados por organismos provenientes de ambientes aquáticos e terrestres. Em geral, há ocorrência de uma grande variedade de espécies, entre moluscos, crustáceos, peixes, répteis, aves e mamíferos (MEIRELES *et al.*, 2007).

De acordo com Schaeffer-Novelli e Cintrón (1990), a distribuição da vegetação característica dos manguezais se dá em zonas, em decorrência do hidrodinamismo das marés e das variações da salinidade. Dessa forma, a zona no manguezal que permanece mais tempo submersa é ocupada principalmente por *Rhizophora mangle* (mangue vermelho), que apresenta como adaptação as raízes escora que auxiliam a fixação da planta. Em seguida temos a zona colonizada principalmente por *Avicennia schaueriana* (mangue preto), dotada de pneumatóforos que auxiliam a troca de gases com a atmosfera. A terceira zona é dominada principalmente por *Languncularia racemosa* (mangue branco), que apresenta glândulas de sal para excretar o excesso de sal absorvido pela planta. Por último, na região mais distante do mar e mais próxima do continente, ocorre à zona de transição para a terra firme, na qual pode ser encontrada a espécie *Conocarpus erectus* (mangue botão) (MEIRELES *et al.*, 2007).

Li e colaboradores (2011) encontraram evidências de que a distribuição das plantas do mangue tem influência direta na estrutura da comunidade microbiana circundante, devido à ocorrência de associações ecológicas entre esses grupos de organismos. Dessa maneira, a zonação das plantas de mangue citadas anteriormente é também uma indicadora da ocorrência de diferentes grupos bacterianos em cada zona, o que ressalta a importância da conservação do ecossistema como um todo.

Hanson e colaboradores (2012), em um trabalho sobre a biogeografia de micro-organismos, afirmaram que, apesar de existirem micro-organismos com distribuição global, estudos de diversidade microbiana têm mostrado a ocorrência de comunidades com composições genotípicas diferentes em ambientes distintos em diversos níveis taxonômicos, ocorrendo até endemismos de alguns grupos. Dessa maneira, a similaridade da composição da comunidade entre dois locais é inversamente proporcional à distância existente entre eles.

Fatores ambientais como clima, geomorfologia, sedimentologia da costa, variação das marés, grau de influência da água doce e regime hidrológico local também têm forte influência na distribuição espacial das comunidades dos manguezais. Dessa forma, o ecossistema apresenta um alto grau de complexidade, integrando diversos fatores biológicos,

físicos e químicos, que culminam no estabelecimento de um ambiente rico e de alta produtividade (SAKHO *et al*, 2011).

O conceito de resiliência refere-se à habilidade de recuperação de um ambiente após um distúrbio. Os manguezais têm uma variedade de características que contribuem para a sua alta capacidade de resiliência, como um grande reservatório de nutrientes no sedimento, que pode repor possíveis perdas de nutrientes do mesmo, altas taxas de decomposição microbiana e de fluxo de nutrientes, que facilitam a renovação da biota, redundância de espécies-chave, entre outros. Devido à sua localização, as florestas de mangue são descritas como ambientes altamente dinâmicos, o que também contribui para a alta capacidade de resiliência, e esse dinamismo é decorrente das variações diárias dos níveis da água, da temperatura e de exposição de sal, além dos diferentes graus de oxigenação (ALONGI, 2008).

Com papel chave nos processos ecológicos e no controle do ambiente químico dos manguezais, a microbiota é à base desse ecossistema e grande contribuinte para a capacidade de resiliência do mesmo. Ela representa a forma de vida mais diversificada e abundante do planeta, sendo estimado que em um grama de sedimento existam aproximadamente 10000 genomas (TORSVIK *et al*, 1998). Sendo assim, os micro-organismos estão diretamente envolvidos em diversos processos físico-químicos como a transformação de nutrientes, fotossíntese, fixação de nitrogênio, metanogênese, solubilidade do fosfato, redução do sulfato e produção de metabolitos, como antibióticos e de enzimas, sendo considerados reservatórios de produtos de interesse biotecnológico (SANTOS *et al*, 2011; KATHIRESAN & SANDILYAN, 2012).

Recentemente, diversas práticas antrópicas como o processamento industrial, derramamentos de óleos e a combustão incompleta de combustíveis fósseis têm ocasionado à acumulação de substratos hidrofóbicos no ambiente. Devido à localização costeira dos manguezais, eles encontram-se entre os principais locais afetados por derramamentos de óleo, pois estão naturalmente susceptíveis a contaminantes provenientes das águas oceânicas. Contudo, diferentemente das costas rochosas, onde o hidrodinamismo das marés ajuda na lavagem da contaminação, os manguezais funcionam como um depósito de óleo, com as marés favorecendo a acumulação de óleo nos sistemas de raízes aéreas e sedimentos (ZHU *et al*, 2001).

Dado o grande potencial genético dos micro-organismos, aliado à sua alta diversidade no ecossistema, quando o manguezal sofre com algum tipo de impacto, seja ele de origem natural ou antrópica, a microbiota tem papel chave na degradação dos contaminantes e na consequente recuperação do ecossistema. Dessa forma, quando adequadamente

compreendida e administrada, a microbiota pode fornecer uma ampla gama de serviços ambientais, sendo uma peça chave na capacidade de resiliência do ecossistema (SANTOS *et al.*, 2011; KATHIRESAN & SANDILYAN, 2012).

2.3 Biossurfactantes

Quando tratamos de substratos hidrofóbicos, um grupo particular de metabólitos microbianos tem grande relevância para a recuperação de ambientes contaminados, os chamados biossurfactantes. Eles são compostos ativos de superfície (SACs, do inglês *Surface Active Compounds*) e apresentam caráter anfipático, ou seja, têm uma fração polar e outra apolar, sendo capazes de aumentar a interação entre moléculas de diferentes graus de polaridade. As características físico-químicas que definem os biossurfactantes são suas habilidades de aumentar a solubilidade em água de compostos hidrofóbicos, de formar emulsões com hidrocarbonetos e de reduzir as tensões superficial e interfacial de líquidos (STEINBÜCHEL, 2011; PACWA-PŁOCINICZAK *et al.*, 2011).

Saimmai e colaboradores (2012a) relataram a ocorrência de espécies produtoras de biossurfactantes em manguezais e ressaltaram a importância desses micro-organismos na recuperação do ecossistema, após a contaminação com substratos oleosos. Diversos fatores como a evaporação, foto-oxidação e volatilização atuam de imediato, mas têm papel principalmente em hidrocarbonetos de baixo peso molecular. Compostos de alto peso molecular tendem a se acumular na superfície da água e a aderir ao substrato, sendo essa etapa de degradação final realizada, sobretudo, pela atividade microbiana. Dessa maneira, as bactérias degradadoras de hidrocarbonetos liberam os biossurfactantes, de forma a facilitar a assimilação desses substratos insolúveis. Algumas das atividades desses compostos, que promovem a dissolução ou emulsificação dos substratos oleosos, aceleram esse processo, aumentando a biodisponibilidade dos mesmos.

Outra atividade encontrada em alguns biossurfactantes é a atividade dispersante. Dispersantes alteram o balanço entre a dispersão natural e a emulsificação, promovendo a primeira e inibindo a segunda, o que é realizado por sua interação com a interface água/óleo. Esses compostos promovem a formação de pequenas gotículas de óleo e retardam a re-coalescência dessas gotículas, uma vez que as mesmas contêm biossurfactantes (Figura 2) (BAKER, 2001; CHANDRASEKAR, SORIAL & WEAVER, 2006).

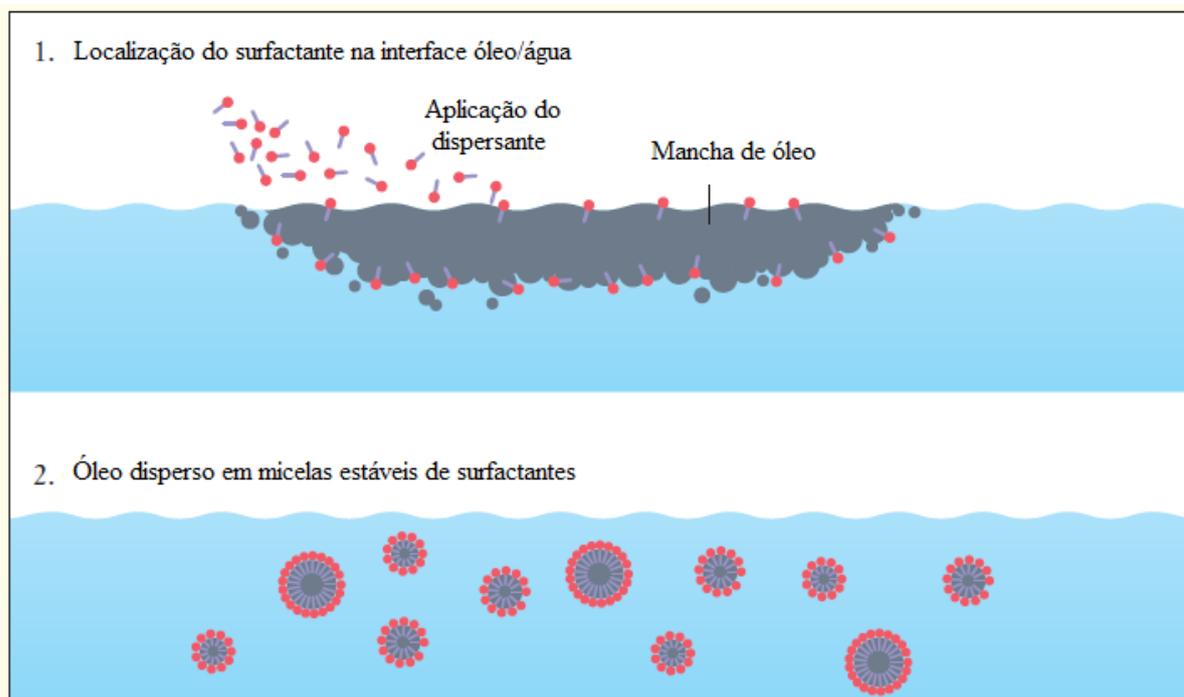


Figura 2 - Mecanismo de ação da atividade dispersante, mostrando sua localização na interface água/óleo (1) e a formação de gotículas de óleo (2) (BAKER, 2001).

Dentre as principais vantagens para os biossurfactantes que apresentam essa atividade destacam-se sua utilização para a remoção de óleos em superfícies, beneficiando organismos marinhos; o aumento da disponibilidade de contaminantes hidrofóbicos, uma vez que aumentam a relação da área de superfície dos mesmos, tornando-os mais expostos à ação bacteriana; a fácil aplicação ambiental dessas moléculas, o que pode ser feito por aeronaves, garantindo a limpeza de grandes áreas de forma rápida; entre outros. Por outro lado, há também desvantagens ao uso desses compostos no ambiente, sendo a principal delas, o aumento temporário na concentração de óleo na água, o que pode ter um efeito tóxico sobre alguns organismos marinhos (BAKER, 2001).

Os biossurfactantes podem ser classificados de acordo com sua composição química, peso molecular, propriedades físico-químicas, modo de ação e origem microbiana. Tendo por base o seu peso molecular, os mesmos podem ser classificados em biossurfactantes de baixo peso molecular, dentre os quais se encontram os glicolipídeos, fosfolipídeos e lipopeptídeos; e de alto peso molecular, referente aos polissacarídeos anfipáticos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou misturas complexas desses biopolímeros (Tabela 1). Em geral, biossurfactantes de baixo peso molecular são bons redutores da tensão superficial, mas não formam emulsões estáveis, enquanto os de alto peso molecular são menos eficazes em diminuir a tensão superficial, mas a sua maioria é capaz de formar boas emulsões, sendo

também chamados bioemulsificantes (NITSCHKE & PASTORE, 2002; PACWA-PŁOCINICZAK *et al*, 2011).

Tabela 1 - Principais biossurfactantes e micro-organismos produtores.

TIPO DE BISSURFACTANTE	MICRO-ORGANISMOS
Glicolipídios	
Ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apícola</i>
Trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
Peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Células	Várias bactérias

(NITSCHKE & PASTORE, 2002)

Conforme as moléculas de biossurfactantes são adicionadas a uma solução, as tensões superficial e interfacial irão diminuir, até que a concentração do agente tensoativo atinja a Concentração Micelar Crítica (CMC). CMC é a concentração a partir da qual as moléculas de biossurfactante iniciam a formação de micelas e é influenciada pela estrutura do tensoativo, bem como pelo pH, força iônica e temperatura da solução. A partir da concentração correspondente à CMC, nenhuma redução nas tensões superficial e interfacial é observada, ainda que a concentração do biossurfactante aumente (STEINBÜCHEL, 2011).

Os micro-organismos capazes de produzir biossurfactantes têm diversas vantagens do ponto de vista ecológico. Considerando que muitos dos biossurfactantes apresentam atividades antibiótica, antifúngica, inseticida, antiviral, imunomoduladora ou antitumoral, a capacidade de produção desses compostos é vantajosa para o micro-organismo no ambiente, auxiliando em situações de competição por recursos, colonização de habitats, obtenção de nutrientes e no estabelecimento de relações simbióticas com outros organismos (RON & ROSENBERG, 2001; STEINBÜCHEL, 2011; PACWA-PŁOCINICZAK *et al*, 2011).

Os biossurfactantes produzidos pelos micro-organismos podem ser liberados para o meio extracelular ou podem ficar localizados na sua superfície, associando-se à membrana celular. De acordo com a sua localização, os mesmos podem apresentar diferentes funções fisiológicas e ecológicas para o micro-organismo produtor (SAIMMAI *et al*, 2012a). Tem sido demonstrado que a excreção de biossurfactantes auxilia a solubilização de compostos hidrofóbicos do ambiente, tornando possível a sua utilização como substrato. Por outro lado, quando o mesmo permanece aderido à parede celular, auxilia na adesão e desorção a superfícies, o que ajuda o micro-organismo produtor a colonizar ambientes hidrofóbicos (RON & ROSENBERG, 2001; RAMKRISHNA, 2010; SATPUTE *et al*, 2010).

As propriedades dos biossurfactantes os tornaram úteis a diversas atividades industriais. Atualmente, a maior demanda para os biossurfactantes vem da indústria petrolífera, onde eles são utilizados na recuperação de petróleo e são incorporados nas formulações de diversos óleos. Contudo, a aplicação mais atrativa num futuro próximo é a biorremediação ambiental, onde eles podem ser utilizados com as finalidades de aumentar a dispersão de óleos, acelerar a biodegradação de poluentes em geral e promover a solubilização de metais pesados (RAMKRISHNA, 2010).

Além das áreas citadas, diversas outras como as indústrias têxtil, farmacêutica, cosmética e alimentícia fazem uso atualmente desses compostos em diversos produtos ou etapas de produção, estando também sempre em busca de novas biomoléculas (SATPUTE *et al*, 2010).

A principal limitação para o uso comercial de biossurfactantes é a complexidade e alto custo de produção, o que tem limitado a sua utilização em larga escala. Até agora, os biossurfactantes mais comercializados são os ramnolipídeos e a surfactina. Contudo, apesar das limitações atuais para a produção comercial de biossurfactantes, há um grande interesse por estes materiais, uma vez que são consideradas alternativas "verdes" aos agentes tensoativos sintéticos (STEINBÜCHEL, 2011).

Os surfactantes sintéticos apresentam maior toxicidade e menor biodegradabilidade, de forma que a sua utilização acarreta sua acumulação na natureza, gerando diversos problemas ecológicos. Por outro lado, como os biossurfactantes têm origem natural, são menos tóxicos e mais facilmente biodegradados, sendo alternativas menos danosas ao ambiente, além de apresentarem estruturas químicas diversificadas e serem mais estáveis em temperaturas e valores de pH extremos (RAMKRISHNA, 2010).

Essa diversidade existente em estruturas dos biossurfactantes, aliada às variadas atividades que os mesmos apresentam, são os principais fatores para o crescente interesse em novas fontes dessas biomoléculas na natureza.

2.3.1 Lipopeptídeos

Os lipopeptídeos representam uma classe de surfactantes microbianos de grande interesse científico, terapêutico e biotecnológico. A característica estrutural dos lipopeptídeos consiste em um ácido graxo específico, combinado com uma porção de aminoácidos. Esses peptídeos normalmente aparecem como misturas de compostos semelhantes, que mostram pequenas variações entre si na sua composição de aminoácidos e/ou na sua porção lipídica. O espectro de atividades já relatadas em lipopeptídeos engloba agentes antibióticos, antivirais, antitumorais, imunomoduladores, toxinas específicas e inibidores enzimáticos (RAMKRISHNA, 2010).

Existe uma grande diversidade de lipopeptídeos na natureza, bem como dos seus micro-organismos produtores, contudo o gênero *Bacillus* se destaca por ser o grupo responsável pela produção de boa parte dos lipopeptídeos conhecidos atualmente (Tabela 2). A espécie *Bacillus subtilis*, em particular, é capaz de produzir o lipopeptídeo surfactina, composto por sete aminoácidos. Um dos biossurfactantes lipopeptídicos mais poderosos descobertos até hoje é a surfactina, sendo capaz de reduzir a tensão superficial de 72 mN/m para 27 mN/m, em concentrações menores que 0,005% (HUE, SEMNI & LAPREVOTE, 2001; ONAIZI, NASSER & TWAIQ, 2012).

Tabela 2 – Micro-organismos produtores de lipopeptídeos e suas respectivas atividades.

Lipopeptídeo	Organismo produtor	Propriedades e atividades
Anfomicina	<i>Streptomyces canus</i>	Antibiótico, inibidor da síntese da parede celular
Clamidocina	<i>Diheterospora chlamydosporia</i>	Citostático e agente antitumoral
Ciclosporina A	<i>Tolypocladium inflatum</i> (<i>Trichoderma polysporum</i>)	Agente antifúngico, imunomodulador
Enduracidina A	<i>Streptomyces fungicidicus</i>	Antibiótico
Globomicina	<i>Streptomyces globocaciense</i>	Antibiótico, inibidor da síntese da parede celular
HC-Toxina	<i>Helminthosporium carbonum</i>	Fitotoxina
Polimixina E1 (Colistina A)	<i>Bacillus polymyxa</i>	Antibiótico
Surfactina	<i>B. subtilis</i>	Agente antifúngico antibacteriano e antiviral
Bacilomicina L	<i>B. subtilis</i>	Agente antifúngico, antibacteriano e antiviral
Iturina A	<i>B. subtilis</i>	Agente antifúngico e antiviral
Micosubtilina	<i>B. subtilis</i>	Agente antimicrobiano
Putisolvina I e II	<i>Pseudomonas putida</i>	Inibidor da formação de biofilme
Plispatina e surfactina	<i>B. licheniformis</i> F2.2	Agente antimicrobiano
Bacilomicina, Plipastatina, Surfactina	<i>B. subtilis</i> BBK1	Inibidor da fosfolipase A
Plipastinas	<i>B. cereus</i> BMG 302	Agente antimicrobiano
Surfactante B1-86	<i>B. licheniformis</i>	Agente antimicrobiano
Halobacillin	<i>Bacillus</i>	Inibidor enzimático
Lichenisina G	<i>B. licheniformis</i> IM 1307	Agente hemolítico e quelante
Artrofactina	<i>Arthrobacter</i>	Agente dispersante de óleo e antimicrobiano
Fengicina	<i>B. thuringiensis</i> CMB26	Controle biológico (fungicida, bactericida e inseticida)
Micobacilina	<i>B. subtilis</i>	Atividade antifúngica

(RAMKRISHNA, 2010)

Em geral, biossurfactantes produzidos por *Bacillus* apresentam boa redução de tensão superficial, baixa CMC e baixa atividade emulsificante. Contudo, a qualidade e a quantidade dos biossurfactantes produzidos estão relacionadas à fonte de carbono e aos nutrientes utilizados para o cultivo (SATPUTE *et al*, 2010).

São diversas as atividades e propriedades observadas nos lipopeptídeos conhecidos atualmente, contudo não há um surfactante que, sozinho, detenha todas as atividades mencionadas. Dessa maneira, é de grande importância a contínua busca por novos micro-organismos produtores, que levem à descoberta de biossurfactantes multifuncionais (RAMKRISHNA, 2010).

2.4 Métodos de seleção de micro-organismos produtores de biossurfactantes

Tendo em vista a grande diversidade microbiana existente do meio marinho, métodos eficazes de seleção de bactérias produtoras de biossurfactantes fazem-se necessários para acessar a riqueza desse ambiente. De acordo com Thavasi, Sharma e Jayalakshmi (2011) os métodos mais adequados para a seleção de produtores de biossurfactante são: medição da tensão superficial, ensaio de dispersão do óleo e ensaio de emulsificação. Por outro lado, a combinação desses métodos seria ainda uma melhor estratégia, uma vez que as características dos biossurfactantes não são necessariamente inerentes a todos esses compostos e a combinação de vários ensaios aumenta as chances de detecção (SATPUTE *et al*, 2010; THAVASI, SHARMA & JAYALAKSHMI, 2011).

Além da obtenção de isolados através de diluição e plaqueamento, estratégias de enriquecimento são muito utilizadas, pois pré-selecionam grupos de interesse de micro-organismos (THAVASI, SHARMA & JAYALAKSHMI, 2011). Especificamente no caso dos biossurfactantes, estratégias como a utilização de substratos hidrofóbicos ou de condições de cultivo específicas podem contribuir para a seleção de grupos de interesse, como o gênero *Bacillus*. Conhecido pela produção de estruturas de resistência denominadas esporos, característica essa inerente a poucos gêneros na natureza, esses organismos têm a capacidade de sobreviver em condições extremas, de forma que a submissão de amostras ambientais a tais condições consiste numa forma de enriquecimento, promovendo a seleção do grupo (HUE, SEMNI & LAPREVOTE, 2001; RON & ROSENBERG, 2001; RAMKRISHNA, 2010).

Apesar dos inúmeros avanços já ocorridos de forma a melhorar as condições sintéticas de cultivo em laboratório, sabe-se que há uma enorme perda da diversidade quando se trabalha com organismos cultiváveis. Isso ocorre por conta de que, além dos fatores nutricionais disponíveis no ambiente, há também diversos fatores ambientais como temperatura, pH, oxigênio, interações com metabólitos provenientes de outros organismos, entre outros, que atuam de forma conjunta e complexa, criando microambientes com características únicas. Contudo, tais métodos da microbiologia básica são e sempre serão de

grande importância, pois permitem testar as mudanças nas respostas fisiológicas dos micro-organismos quando submetidos a diferentes condições de cultivo (SCHMIDT, 2006).

Dessa forma, a biologia molecular surgiu como uma alternativa que proporcionou, em alguns casos, o acesso a uma biodiversidade bem maior do que a obtida pelos métodos tradicionais de cultivo e, em outros casos, uma contribuição para um estudo mais aprofundado de micro-organismos cultiváveis, tornando possível obter informações genéticas dos mesmos, acerca da ocorrência de genes que não apresentam expressão constitutiva ou de genes que auxiliam sua identificação taxonômica (SCHMIDT, 2006). Para tanto, o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi um importante marco para a biologia molecular.

No caso particular dos biossurfactantes, a PCR é largamente utilizada para verificar a ocorrência de genes envolvidos na sua produção. Três genes pertencentes ao grupo dos lipopeptídeos já foram descritos na literatura. O primeiro deles, o gene *sfp*, foi isolado e caracterizado em 1992, por Nakano e colaboradores, tendo sido descrito inicialmente como um gene de função desconhecida, mas que era fundamental à síntese da surfactina. Em estudos posteriores, Hsieh e colaboradores (2004) descreveram uma forma rápida de detectar micro-organismos produtores de surfactina, através da realização da PCR com iniciadores específicos para o gene *sfp*. Em seu trabalho, dois genes são relatados como essenciais à produção da surfactina: um operon de 25kb, denominado *srfA*, que é responsável pela esporulação e pela competência no desenvolvimento do micro-organismo, e o gene *sfp*, localizado a 4 kb do operon *srfA*, responsável pela codificação de uma enzima pertencente à super família 4-fosfopanteteiniltransferase, apresentando papel regulatório na biossíntese da surfactina (NAKANO *et al*, 1992; HSIEH *et al*, 2004).

Os outros dois genes são lipopeptídeos pertencentes à família da iturina e também tiveram seus mecanismos de biossíntese parcialmente elucidados. O operon da Iturina A abrange uma região em torno de 38kb, sendo compostos por quatro “janelas de leitura aberta” (ORFs – *Open Reading Frame*): *ituD*, *ituA*, *ituB* e *ituC*. O gene *ituD* codifica a enzima malonil coenzima A transacilase, cuja ausência ocasiona uma deficiência na produção da iturina. Já o gene *lpa-14* codifica para a enzima 4'-fosfopanteteinil transferase, requerida para a maturação da iturina A. Em outras palavras, ambos os genes têm papéis-chaves na produção do peptídeo iturina A, sendo largamente utilizados em estudos de seleção de organismos que os produzam (HSIEH *et al*, 2008; LIN, TSANG & LIU, 2011).

Dada à importância de ambos os métodos, de cultivo e molecular, o ideal é utilizá-los de forma conjunta, para que cada um contribua à sua maneira. Nesse estudo, métodos

tradicionais de cultivo foram aliados aos métodos moleculares, de forma a promover uma melhor seleção de micro-organismos produtores de biossurfactantes.

3 Objetivos

3.1 Objetivos gerais

Este estudo teve por objetivo o isolamento e seleção de bactérias produtoras de surfactantes lipopeptídeos presentes em sedimentos de dois manguezais do Ceará, a fim de verificar se a frequência desses produtores é maior em um manguezal impactado.

3.2. Hipótese

Considerando que surfactantes são compostos anfipáticos que possuem a capacidade de diminuir a tensão superficial ou a tensão interfacial e, devido a esta habilidade, possuem um papel importante na biorremediação de sedimentos e águas contaminados com poluentes hidrofóbicos, então a riqueza de bactérias produtoras desses compostos é maior em um manguezal contaminado com resíduos oleosos do que em um manguezal pristino.

4 Materiais e métodos

4.1 Áreas de coleta

As áreas de coleta compreenderam dois manguezais do Ceará, sendo eles o manguezal do Timonha (Município de Barroquinha) e o manguezal da Barra Grande (Município de Icapuí).

O estuário do rio Timonha está situado no litoral oeste do Estado do Ceará, na divisa com o Estado do Piauí, há aproximadamente 500 km de Fortaleza. Compreende uma das maiores áreas de bosque de mangue do Nordeste do Brasil (cerca de 10.000 hectares), além de abrigar espécies criticamente ameaçadas de extinção e representar uma das principais áreas de pouso e alimentação de aves migratórias na região. Por estar localizada dentro da APA Delta do Parnaíba e pela dificuldade de acesso ao local é o manguezal em melhor nível de conservação dentre os manguezais do Ceará. Por esse motivo, a região foi utilizada nesse trabalho para fins comparativos, representando um manguezal pristino (SILVA & SOUZA, 2006).

O manguezal da Barra Grande, localizado no município de Icapuí, está situado no litoral leste do Estado do Ceará, há aproximadamente 200 km de Fortaleza. Compreende uma área de cerca de 1.200 hectares, sendo considerada uma região vulnerável por estar situada dentro de uma região de extração de petróleo. A extração de petróleo teve início em 1990 na região, sendo hoje considerada a maior área produtiva de petróleo *on shore* do Estado do Ceará (LOTTA & MARTINS, 2003). Nessa região já foram registrados acidentes de vazamentos de óleo (Disponível em: <<http://sindipetroce-pi.org.br/a-vereadora/sindipetrocepi>>. Acesso em: 11/04/2013).

4.2 Método de coleta

As amostragens dos sedimentos dos manguezais foram realizadas durante a maré de sizígia (amplitude 0.1) a profundidades de 0-10 cm. Foram estabelecidos quinze pontos de coleta ao longo de cada um dos manguezais. No manguezal do rio Timonha, por ser bastante conservado, é possível a observação de três zonas no mangue: região sem vegetação, rizosfera de *Rhizophora mangle* e rizosfera de *Avicennia schaueriana*. Dessa maneira, os pontos foram distribuídos de forma equitativa entre as três zonas, tendo sido coletados cinco pontos em cada uma. As cinco amostras de cada zona foram depois reunidas em uma amostra composta (*pool*). No manguezal de Icapuí, como a estratificação da vegetação não é tão evidente, a

coleta foi feita em pontos distribuídos de maneira sigmóide ao longo do manguezal. Dessa maneira, os *pools* foram constituídos também por cinco amostras cada um, tendo sido organizados pela proximidade entre pontos (Figura 3). Em ambos os manguezais, os pontos de coleta foram marcados com o auxílio de um GPS (Apêndice A).

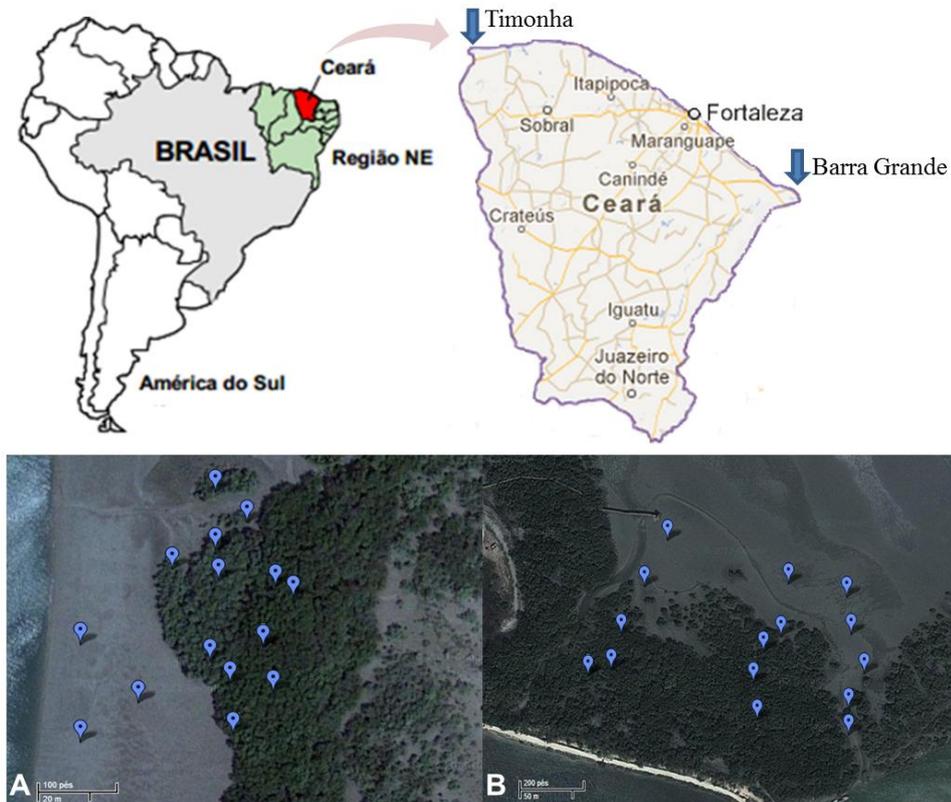


Figura 3 - Imagens de satélite mostrando os pontos de coleta de sedimentos nos manguezais de Timonha (A) e Icapuí (B).

Em cada ponto, a amostra de sedimento foi retirada com a utilização de um amostrador cilíndrico de PVC com 10 cm de diâmetro e 40 cm de comprimento, e transferida assepticamente para um frasco esterilizado. As amostras de sedimentos foram conduzidas ao laboratório em uma caixa resfriada, mantendo a condição da temperatura em torno de 4-8 °C. Em seguida, 25 gramas de cada *pool* de sedimento devidamente homogêneos foram usados imediatamente para isolamento de micro-organismos por métodos tradicionais de cultivo.

4.3 Isolamento e cultivo dos micro-organismos

Para a obtenção dos isolados, o sedimento foi submetido a um aquecimento térmico a 60 °C por 60 minutos, estratégia essa adotada com a finalidade de selecionar bactérias produtoras de esporos, como as do gênero *Bacillus*, reconhecidamente produtoras de

biossurfactantes. Os sedimentos foram posteriormente diluídos em solução salina 0,9% e inoculados em ATGE (5,0 g de triptona, 1,0 g de glicose, 2,5 g de extrato de levedura, 15,0 g de ágar por litro de meio). As culturas foram incubadas a 37 °C por 48 h e logo após, colônias com distintas características culturais foram transferidas para uma segunda placa de meio ATGE, de forma a serem obtidas linhagens puras. Em seguida, foram organizados estoques das bactérias obtidas e as mesmas passaram a ser mantidas a -80 °C, em meio TGE.

Cada bactéria foi cultivada isoladamente e em duplicada em Caldo Surfactina por 24 h, e uma suspensão celular em fase exponencial foi retirada e teve sua absorbância ajustada para 0.170 ± 0.020 , a 600 nm, de forma a constituir inóculo de 10% (v/v), correspondente a 5 mL. O inóculo ajustado foi então transferido para um volume maior de Caldo Surfactina (50 mL), no qual as culturas permanecerem sob agitação contínua de 150 rpm, a 30 °C por 48 h. O Caldo Surfactina é composto por: 10,0 g de glicose; 5,0 g de extrato de levedura; 1,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 6,0 g de Na_2HPO_4 ; 3,0 g de KH_2PO_4 ; 2,7 g de NaCl e 0,6 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por litro de água destilada, com pH 7,0 (MORÁN *et al.*, 2000, com modificações). Ao meio pronto foi acrescido 0,1% (v/v) de solução de micronutrientes composta por 10,95 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5,0 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,54 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,39 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,25 g de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,17 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ por litro de água.

4.4 Seleção das linhagens isoladas para a produção de biossurfactantes

4.4.1 Ensaio de emulsificação

Após o cultivo por 48 h, as culturas foram centrifugadas, de forma promover a separação das células e do sobrenadante, e ambos foram utilizados separadamente para o ensaio de emulsificação. As células obtidas foram lavadas e eluídas em 50 mL de água destilada antes da realização do ensaio e o mesmo foi realizado em duplicata.

A determinação da capacidade emulsificante foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Iqbal, Khalid e Malik (1995). O ensaio foi realizado adicionando-se 2 mL de querosene (ESSO, BR) à 2 mL do sobrenadante ou das células eluídas em água em um tubo de ensaio, e agitando-o vigorosamente (vortex) por 2 minutos. Os tubos foram deixados em repouso por 24 horas, a 25 °C, e o percentual de emulsificação (E24) foi calculado de acordo com a Equação 1:

$$\text{E24} = \text{Camada emulsificada} / \text{Altura total} \times 100$$

4.4.2 Tensão superficial

As medidas de tensão superficial dos sobrenadantes foram realizadas com um tensiômetro (Krüss, modelo K6) utilizando o método De Nöuy, no qual se observa a resistência do anel de platina em romper a tensão de superfície do líquido testado. Para cada amostra analisada foram necessários 30 mL de sobrenadante livre de células. O equipamento foi previamente calibrado com água destilada, com valor de tensão superficial equivalente a 72 mN/m, e Caldo Surfactina estéril foi utilizado como controle, cuja tensão superficial corresponde a 60 mN/m, ambos medidos na temperatura de 25 °C. Para fins comparativos, foi analisada também a capacidade de redução da tensão superficial do meio com um surfactante sintético, o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 1% m/v. Os valores foram expressos em porcentagem, calculados de acordo com a Equação 2:

$$TS = (TS_i - TS_f) / TS_i \times 100$$

Onde TS_i = Valor da tensão superficial do meio de cultura antes do inóculo, correspondente a 60 mN/m; TS_f = Valor da tensão superficial após cultivo de 48 h.

4.4.3 Pesquisa de genes de lipopeptídeos

A extração do DNA genômico foi realizada segundo a metodologia do CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio) de acordo com o protocolo descrito por Warner (1996). Ao final da extração, o DNA obtido foi eluído em 50 µl de Tris-EDTA (10 mM:1 mM, pH 8.0) com 20 µg/µl de RNase. O rendimento obtido foi estimado pela medida da absorbância a 260 nm, em espectrofotômetro do tipo Nanodrop (ND-1000 - Nanodrop, USA).

Após a extração de DNA, a PCR foi utilizada para detectar a presença de genes envolvidos na produção de biosurfactantes já conhecidos. Dessa maneira, foi pesquisada a presença do gene *sfp*, relacionado com a produção de surfactina, e dos genes *ituD* e *lpa14*, relacionados com a produção de iturina. Devido às diferentes temperaturas de anelamento ideais para cada iniciador e aos tamanhos dos fragmentos amplificados, foram estabelecidos dois programas de PCR.

Para as PCRs do gene *sfp*, foram utilizados os iniciadores *sfp*-F (5'-ATG AAG ATT TAC GGA ATT TA-3') e *sfp*-R (5'-TTA TAA AAG CTC TTC GTA CG-3'), usando a seguinte programação: desnaturação a 94 °C por 30 segundos; 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 46 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto; e 72

°C por 10 minutos (HSIEH *et al*, 2004). Para as PCRs dos genes *ituD* e *lpa-14*, foram utilizados, respectivamente, os seguintes pares de iniciadores: *ituD*-F (5'-ATG AAC AAT CTT GCC TTT TTA-3') e *ituD*-R (5'-TTA TTT TAA AAT CCG CAA TT-3'), *lpa-14*F (5'-ATG AAA ATT TAC GGA GTA TA-3') e *lpa-14*R (5'-TTA TAA CAG CTC TTC ATA CG-3'). Como os fragmentos amplificados por cada par de iniciadores são de tamanhos diferentes e as temperaturas de anelamento são semelhantes, foi realizada uma PCR *multiplex*, onde em uma mesma reação, os dois conjuntos de iniciadores estavam presentes. A programação utilizada teve a seguinte sequência: desnaturação a 94 °C por 30 segundos; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 50 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1,5 minutos; e 72 °C por 10 minutos (HSIEH *et al*, 2008; LIN, *et al*, 2011).

Os produtos de PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1%, marcado com SYBRTM Safe DNA e o marcador utilizado foi de 50 kb (PROMEGA, USA). Os fragmentos amplificados têm os comprimentos de 675 pb para o gene *sfp*, 1203 pb para o gene *ituD* e de 675 pb para *lpa14*. Foram utilizadas como controles positivos as cepas *B. subtilis* LAMI008 (BARRETO *et al*, 2010) para surfactina e *Bacillus* sp. 255 para iturina.

4.5 Teste da dispersão do óleo

O teste da dispersão do óleo foi realizado segundo Morikawa, Hirata e Imanaka (2000), com adaptações. O ensaio mede o diâmetro de áreas limpas formadas quando uma gota de uma solução contendo biossurfactante entra em contato com uma superfície do filme de óleo. O diâmetro da área formada é um indicativo da produção da biomolécula, consistindo também em uma maneira de simular a sua eficácia para aplicações em situações de biorremediação de ambientes contaminados com petróleo. O teste foi realizado com os isolados que apresentaram pelo menos um dos genes pesquisados. O ensaio foi realizado em placas de Petri de diâmetro 100 x 20 mm, em duplicata para cada isolado, onde foram adicionados 50 mL de água destilada, acrescidos de 0,5% de petróleo (0,25 g). Em seguida, 100 µl do sobrenadante da cultura esterilizado por autoclavação (121 °C/15 minutos) foi depositado sobre a superfície da mistura água-óleo, e o diâmetro dos halos formados foram medidos. O controle do ensaio foi realizado com o meio de cultura estéril, e o petróleo utilizado nesse ensaio foi obtido da Fazenda Belém, situada nos municípios de Aracati e Icapuí.

4.6 Extração dos biossurfactantes produzidos pela linhagens promissoras

A extração dos biossurfactantes foi realizada de acordo com Giro e colaboradores (2009). Os isolados que se destacaram nas atividades de redução de tensão superficial e de emulsificação foram cultivados nas mesmas condições descritas anteriormente, tendo sido centrifugadas a 10000 g, a 4 °C por 15 minutos, para a separação das células. Em seguida, 20 mL do sobrenadante foram recolhidos e ajustado para pH 2,0 com KCl 3M. A solução resultante permaneceu em repouso por aproximadamente 18 h, a 4 °C, para que ocorresse a precipitação dos biossurfactantes. Após esse tempo, o extrato rico em surfactante foi novamente centrifugado a 10000 g, a 4 °C por 15 minutos. O precipitado obtido foi dissolvido em 8,0 mL de água deionizada com pH 8,0 e posteriormente fez-se extração líquido-líquido utilizando cloreto de metileno (1:1). A mistura foi agitada por 5 minutos e permaneceu em repouso por uma hora em funil de separação para que ocorresse a separação das fases. A fase contendo o solvente e os biossurfactantes foi recolhida em becker após o tempo de espera. Esse procedimento foi repetido três vezes e o material permaneceu em temperatura ambiente para que ocorresse a evaporação do solvente. No final do processo, o produto obtido foi ressuspenso em 5,0 mL de metanol para posterior análise.

4.7 Determinação da concentração do biossurfactantes

A concentração do surfactante foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), acoplado com detector UV (Waters, modelo 2487) e equipado com a coluna de fase reversa Symmetry C₁₈ (150 x 4,6 mm, 5µm, Waters, Irlanda), utilizando fase móvel formulada com 20% de ácido trifluoracético (3,8mM) e 80% de acetonitrila na vazão de 1 mL.min⁻¹ a 25 °C. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL e o tempo de análise para cada amostra foi de 40 minutos, em duplicata. As amostras foram quantificadas através de uma curva de calibração com surfactina padrão 95% da Sigma-Aldrich (WEI & CHU, 2002; YEH, WEI & CHANG, 2005).

5 Resultados e Discussão

5.1 Isolamento e seleção das bactérias produtoras de biossurfactantes

A estratégia de isolamento utilizada nesse estudo resultou na seleção de 200 isolados bacterianos, sendo 100 provenientes do manguezal de Timonha (zona oeste do litoral do Ceará) 100 do manguezal de Icapuí (zona leste do litoral). Em média, foram selecionados 33 isolados a partir de cada um dos diferentes habitats desses manguezais. Os isolados foram nomeados com as três letras iniciais do manguezal de origem, seguido do número atribuído a cada isolado.

Hong e colaboradores (2009) estudaram a abundância de bactérias produtoras de esporos no sedimento, selecionando-as através do aquecimento térmico do sedimento (65 °C/45 min). Como conclusão do trabalho, a concentração de bactérias do gênero *Bacillus* produtoras de esporos foi estimada em 10⁶ esporos/g de sedimento. No presente trabalho, foi adotado o aquecimento térmico de 60 °C/1 h para a seleção de linhagens produtoras de esporos, uma vez que já foi demonstrado que alguns esporos têm sua viabilidade reduzida significativamente em temperaturas de 65 °C (HOA *et al*, 2000).

O cultivo dos micro-organismos selecionados foi realizado por 48 horas, uma vez que, de acordo com dados na literatura, alguns lipopeptídeos têm sua síntese iniciada na fase estacionária do crescimento celular, de forma que, muitas vezes, o cultivo por 24 horas não é suficiente para a recuperação do biossurfactante (JACQUES *et al*, 1999). Por esse motivo, considerando que o objetivo desse estudo era realizar uma seleção de bactérias potencialmente produtoras de biossurfactantes, foi adotado o cultivo de 48 h.

Para o estudo do potencial dos micro-organismos selecionados para a produção de biossurfactantes foram escolhidos, inicialmente, ensaios que se baseiam em propriedades encontradas em todos os grupos de biossurfactantes, sendo elas a capacidade de formar emulsões e a capacidade de reduzir a tensão superficial (STEINBÜCHEL, 2011; PACWA-PŁOCINICZAK *et al*, 2011).

Levando em conta que os biossurfactantes produzidos pelos micro-organismos podem ser liberados para o meio extracelular ou permanecerem ligados à superfície celular, o ensaio de emulsificação foi realizado com os sobrenadantes e com as células lavadas e eluidas em água destilada, separadamente, de forma a elucidar qual a localização dos mesmos (SATPUTE *et al*, 2010). Os resultados obtidos nos ensaios de emulsificação realizados com as células eluidas em água destilada podem ser visualizados na Figura 4.

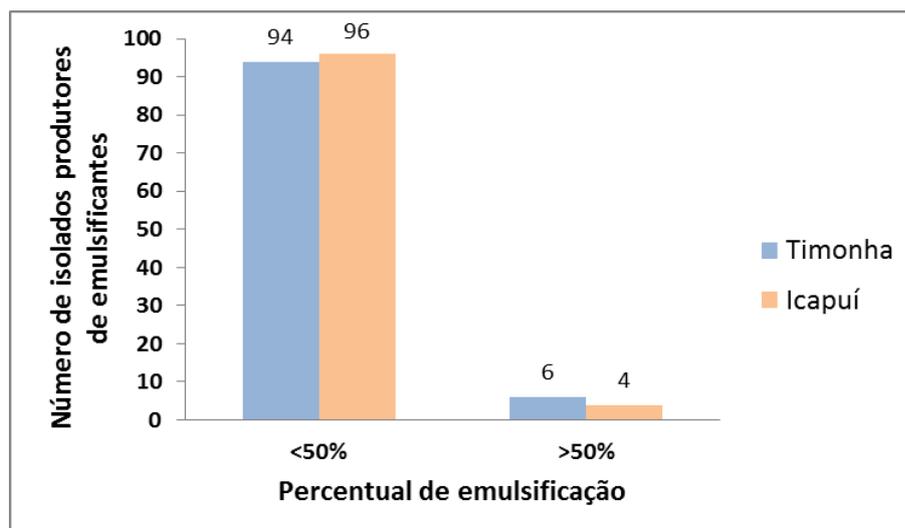


Figura 4 – Número de isolados produtores de emulsificantes versus percentual de emulsificação produzida pela biomassa das culturas de bactérias provenientes de sedimentos dos manguezais de Timonha e Icapuí.

De acordo com Willumsen & Karlson (1997), um bom agente emulsificante apresenta um índice de emulsificação superior a 50%. Seguindo a classificação sugerida por esses autores, observa-se que dentro dessa faixa de interesse encontram-se 10 isolados, sendo 6 provenientes de Timonha, e 4 de Icapuí. Já na faixa dos isolados que produziram emulsões com índices abaixo de 50%, foram obtidos 94 isolados de Timonha, e 96 de Icapuí.

Em um primeiro momento, observa-se que não há diferença entre os manguezais que possa ser atribuída ao seus respectivos graus de impacto. Por outro lado, é importante salientar que substratos hidrofóbicos estão presentes em ambos os manguezais, sejam eles de origem natural ou antrópica. Conseqüentemente, há também a ocorrência natural de espécies produtoras de compostos que permitam o acesso a esses substratos hidrofóbicos, como os biossurfactantes.

A faixa representada pelas emulsões superiores a 50% aponta o índice de ocorrência dos isolados com maior hidrofobicidade celular, capazes de colonizar e/ou incorporar substratos com elevado caráter apolar. Por outro lado, na faixa representada pelos valores inferiores a 50% existem isolados com graus de hidrofobicidade celular variáveis, variando desde superfícies hidrofílicas a superfícies com grau de hidrofobicidade intermediário. Considerando que na natureza existem compostos com graus de polaridade variáveis, esses micro-organismos apresentam também importante papel na metabolização de substratos menos hidrofóbicos. Outro ponto importante é a afinidade do biossurfactante com o composto hidrofóbico do ambiente. Seguindo esse raciocínio, alguns micro-organismos que foram enquadrados na faixa de emulsificação com índices inferiores a 50% também podem ser

fundamentais para emulsionar substratos hidrofóbicos específicos, por terem uma afinidade maior com estes.

Em relação aos ensaios de emulsificação realizados com os sobrenadantes das culturas, os resultados também foram organizados levando em conta a classificação proposta por Willumsen & Karlson (1997) e estão representados na Figura 5.

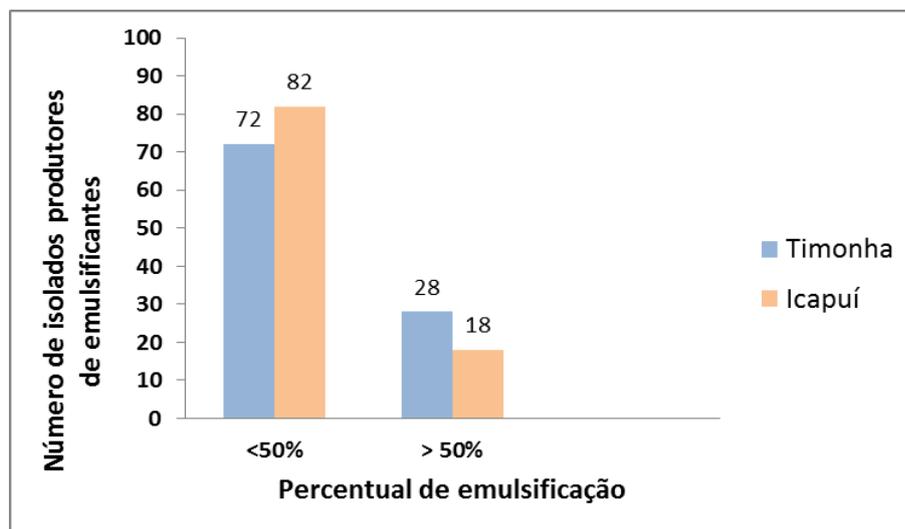


Figura 5 – Número de isolados produtores de emulsificantes versus percentual de emulsificação produzidos pelos sobrenadantes das culturas de bactérias provenientes de sedimentos dos manguezais de Timonha e Icapuí.

Os dados mostram que na faixa correspondente aos bons agentes emulsificantes (E24 superior a 50%), foram obtidos 28 isolados do Timonha e 18, de Icapuí. Comparando os valores obtidos nos dois ensaios de emulsificação, observa-se que uma quantidade maior de isolados mostrou-se capaz de secretar o biossurfactante para o meio extracelular do que de mantê-lo em sua parede celular.

De acordo com os resultados obtidos, a fração correspondente às emulsificações superiores a 50% agrupa os isolados que têm o maior potencial para contribuir, no ambiente em que vivem, para a emulsificação de compostos apolares presentes no ambiente. Uma vez emulsificados, esses compostos tornam-se mais biodisponíveis para toda a comunidade microbiana, o que acelera o processo de metabolização dos mesmos (BAKER, 2001). Por outro lado, a faixa correspondente aos valores inferiores a 50% de emulsificação também apresenta isolados com importante valor no ambiente, com importante atuação em substratos com menor grau de hidrofobicidade. Considerando que a formação de emulsões está relacionada com o grau de afinidade entre o biossurfactante e o composto hidrofóbico e sabendo que no ambiente há ocorrência de uma grande diversidade de compostos hidrofóbicos, supõe-se que alguns desses isolados também possam estar contribuindo para a

emulsão de outros compostos apolares presentes no ambiente, com os quais apresentem maior afinidade.

É importante ressaltar que a possibilidade de detecção da atividade emulsificante de um surfactante está relacionada com a sua afinidade com o hidrocarboneto testado. Dessa forma, os ensaios de E24 foram realizados com querosene, que consiste em uma mistura de hidrocarbonetos, de forma a garantir uma maior chance de detecção do potencial emulsificante dos isolados.

Krepky e colaboradores (2007) cultivaram diferentes consórcios bacterianos obtidos de sedimentos de manguezais para pesquisar a produção de biossurfactantes. Para tanto, realizaram ensaios de emulsificação com diversos hidrocarbonetos, sendo eles querosene, gasolina e óleo árabe leve, encontrando diferenças de até 50% entre os índices de emulsificação com diferentes hidrocarbonetos. Esse trabalho reforça o que foi dito anteriormente, uma vez que a emulsão obtida vai ser diretamente afetada pelo grau de afinidade entre o biossurfactante e o hidrocarboneto.

É importante ressaltar que tanto as células quanto os sobrenadantes dos isolados denominados TIM 49, TIM 72, ICA 24 e ICA 88 produziram índices de emulsificação superiores a 50%. Existe a possibilidade, ainda que pouco provável, de apenas um biossurfactante estar sendo produzido, mas normalmente observa-se a produção de formas isômeras. Por outro lado há também a possibilidade de haver a produção simultânea de mais de um surfactante, fato esse já observado em diversas espécies de *Bacillus* (STANKOVIĆ *et al.*, 2012), e eles estarem apresentando comportamentos diferentes em relação à localização celular. Em ambos os casos, essas linhagens apresentam elevado valor ecológico e potencial biotecnológico.

Hamed e colaboradores (2012) realizaram uma seleção com 16 isolados, em busca de linhagens produtoras de biossurfactantes. No trabalho foram realizados ensaios de emulsificação com a suspensão celular após o cultivo, e o maior índice de emulsificação observado foi de 42%, estando abaixo do valor sugerido por Willumsen & Karlson (1997) do correspondente a um bom agente emulsificante. Contudo, observa-se que dos 16 isolados do trabalho, apenas dois eram pertencentes ao gênero *Bacillus*. Dessa maneira, os elevados índices de emulsificação produzidos por alguns dos isolados nesse estudo são um indicativo de que o tratamento térmico do sedimento antes do isolamento das bactérias foi eficaz para o enriquecimento das linhagens produtoras de esporos, e possivelmente do gênero *Bacillus*, reconhecidamente já referido como um bom produtor de biossurfactantes.

Os 200 isolados obtidos foram também testados quanto à sua capacidade de reduzir a tensão superficial do meio de cultura (Caldo Surfactina), cuja tensão superficial inicial é 60 mN/m. Os resultados obtidos também foram agrupados em faixas e podem ser visualizados na Figura 6.

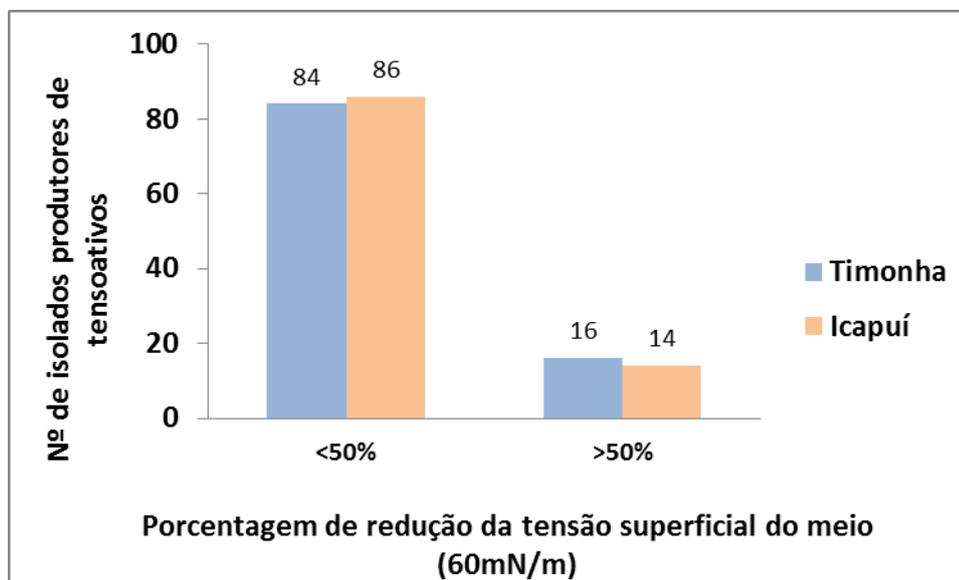


Figura 6 – Número de isolados versus percentual de redução da tensão superficial do caldo surfactina produzida por biossurfactantes produzidos por isolados de bactérias provenientes de sedimentos dos manguezais de Timonha e Icapuí.

De acordo com Mulligan (2005), um bom tensoativo é aquele capaz de reduzir a tensão superficial da água para 35 mN/m, o que equivale a 50% do seu valor inicial. Como o meio de cultura utilizado nesse trabalho apresentou tensão superficial inicial de 60mN/m, foram considerados bons agentes tensoativos os biossurfactantes que foram capazes de reduzir a tensão para valores iguais ou menores a 30 mN/m, o que também corresponde a 50% do valor inicial.

Na faixa correspondente aos bons agentes tensoativos, (reduções superiores a 50%) foram selecionados 30 isolados, sendo 16 provenientes do manguezal do Timonha e 14 de Icapuí. O surfactante comercial SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) a 1% foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio de cultura em apenas 33% do valor inicial. Dessa forma, ressalta-se o valor dos resultados obtidos, uma vez que as moléculas produzidas não passaram por nenhum processo de purificação. Estudos que envolvam a descoberta de novos biossurfactantes devem ser, portanto, incentivados, pois os ambientes naturais detêm diversas fontes promissoras desses compostos e que podem ser substitutas aos produtos sintéticos utilizados atualmente no mercado.

Das e Mukherjee (2007) estudaram a capacidade de produção de biossurfactantes de duas cepas de *Bacillus subtilis* e obtiveram excelentes índices de emulsificação, além de os

biossurfactantes terem demonstrado também um grande potencial para a biorremediação, tendo sido capazes de liberar uma grande quantidade de óleo presente em uma coluna de areia. Com base nesse trabalho, espera-se que os isolados que se destacaram no presente trabalho possam também representar alternativas promissoras para aplicações em situações de biorremediação.

Alguns isolados se destacaram por produzirem emulsificantes e outros por serem capazes de reduzir a tensão superficial do meio, enquanto alguns demonstraram as duas características. A Figura 7 resume as potencialidades dos 200 isolados estudados.

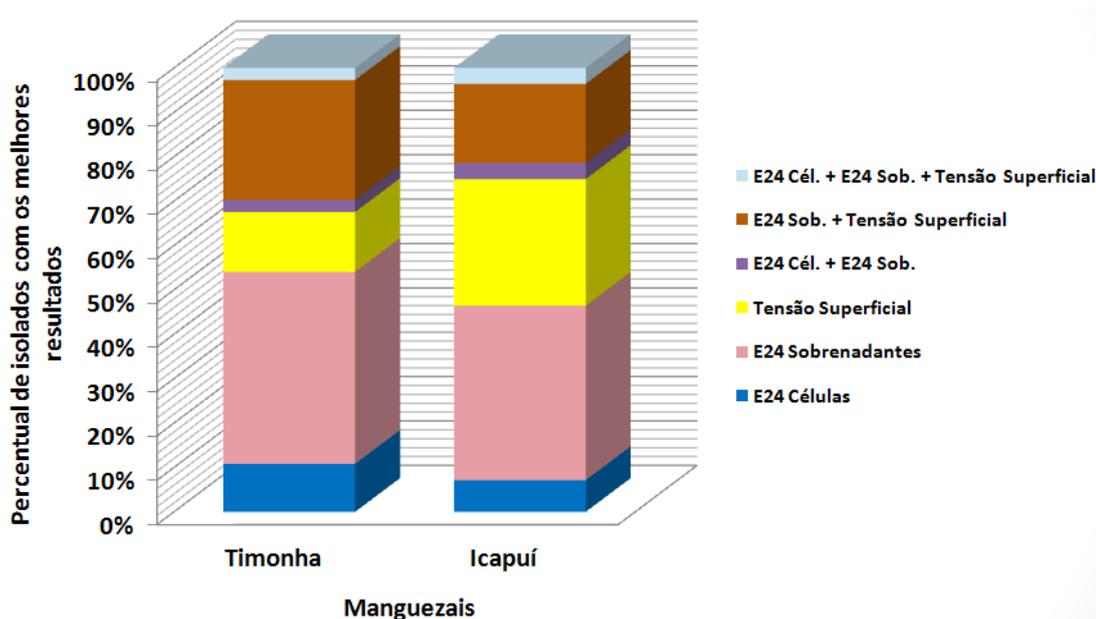


Figura 7 – Potencialidades dos isolados provenientes dos manguezais de Timonha e Icapuí para emulsificação e redução da tensão superficial.

Tendo por base as potencialidades para a produção de compostos ativos de superfície dos 200 isolados, os mesmos foram classificados em seis grupos funcionais. O primeiro grupo é composto por bactérias que se destacaram apenas no ensaio do E24 com as células, sendo representado por 4 isolados de Timonha e 2 de Icapuí. Sabe-se que a localização de biossurfactantes na parede celular tem importante papel na alteração da hidrofobicidade celular, auxiliando a incorporação de moléculas hidrofóbicas, bem como a aderência a substratos apolares. Dessa forma, supõe-se que os isolados pertencentes a esse grupo possam ser capazes de auxiliar diretamente na metabolização de compostos apolares e/ou colonizá-los.

O segundo grupo é composto por isolados que se destacaram apenas nos ensaios de emulsificação com seus sobrenadantes, sendo formado por 16 isolados de Timonha e 11 de Icapuí. De acordo com a literatura, o papel natural de biossurfactantes que são expelidos para o meio extracelular consiste em auxiliar a emulsificação de substratos oleosos, aumentando

sua biodisponibilidade para a comunidade, além de poder ter papel intermediando interações ecológicas com outros organismos, uma vez que alguns desses compostos apresentam atividades antimicrobianas, antivirais e antifúngicas (RON & ROSENBERG, 2001; STEINBÜCHEL, 2011; PACWA-PLÓCINICZAK *et al*, 2011). Dessa maneira, supõe-se que os micro-organismos selecionados tenham importante papel ecológico nos seus ambientes naturais, auxiliando indiretamente a metabolização dos substratos hidrofóbicos, tornando-os mais acessíveis para a comunidade.

O terceiro grupo representa os isolados que apresentaram boas atividades tensoativas, capazes de reduzir em 50% ou mais o valor da tensão superficial inicial do meio. O grupo é composto por 5 isolados de Timonha e 8 de Icapuí. Biossurfactantes com essa propriedade contribuem para aumentar o grau de interação entre moléculas imiscíveis, o que nos leva a supor que os isolados pertencentes a este grupo também contribuam para aumentar a biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos do ambiente, atuando conjuntamente com os isolados capazes de secretar biossurfactantes para o meio extracelular.

As interseções entre as atividades descritas são representadas por três grupos. Duas bactérias, TIM 72 e ICA 88, apresentaram bons índices de emulsificação para as células e para os sobrenadantes. A presença das duas atividades em um mesmo isolado pressupõe uma maior contribuição para a metabolização de compostos apolares, uma vez que esses isolados têm potencial para emulsioná-los no ambiente e incorporá-los.

Nenhum isolado que tenha demonstrado boa atividade de E24 com as células e boa capacidade de redução da tensão superficial foi detectado nos dois manguezais. Já o grupo formado por bactérias que apresentaram bons índices de emulsificação com o sobrenadante e, concomitantemente, foram bons agentes tensoativos (sexto grupo) foi composto por 10 isolados de Timonha e 5 de Icapuí. Biossurfactantes que apresentam, concomitantemente, boas taxas de emulsificação e boa atividade tensoativa são ainda mais eficazes em aumentar a biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos no ambiente, tornando miscíveis duas fases de polaridades diferentes.

Por último, tem-se o grupo dos isolados que apresentaram excelentes atividades para todos os ensaios realizados, representado por apenas um isolado de cada manguezal (ICA 24 e TIM 49). Esses micro-organismos são capazes de aderir, incorporar e emulsionar compostos oleosos presentes no ambiente.

Todos os dados obtidos foram relacionados no Apêndice B, apresentado no final deste trabalho.

5.2 Reação de PCR para os genes *sfp*, *ituD* e *lpa14*

Apesar de os métodos tradicionais de cultivo serem de grande valia na microbiologia, as condições de cultivo são determinantes para a expressão ou não de alguns genes. Com base nisso, todos os 200 isolados foram submetidos a PCR utilizando iniciadores específicos para os genes *sfp*, envolvido na síntese da surfactina, e *ituD* e *lpa14*, envolvidos na síntese da iturina, ambos pertencentes à família dos lipopeptídeos.

Os resultados positivos obtidos para o gene *sfp* dos 200 isolados estão mostrados na Figura 8.

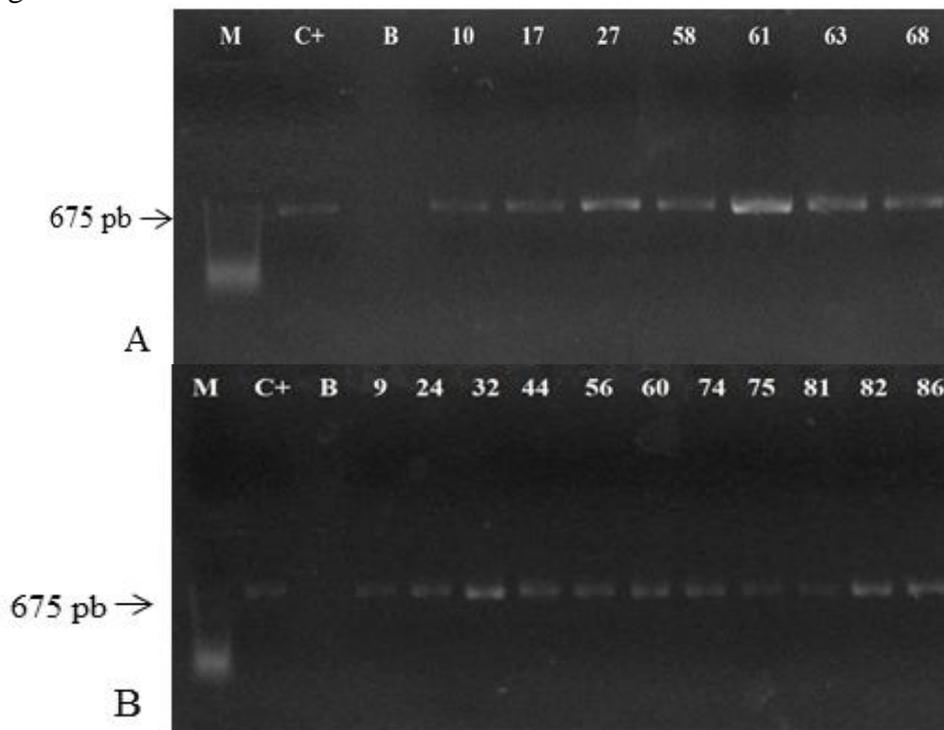


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose (1%) mostrando os isolados positivos de Timonha (A) e de Icapuí (B), para o gene *sfp*. C⁺ - Controle positivo, *B. subtilis* LAMI008; B - Branco da reação.

Das 200 linhagens obtidas, o manguezal de Timonha teve a menor taxa de ocorrência do gene *sfp*, estando esse presente em apenas 7% dos isolados, dos quais 3 foram provenientes da área sem vegetação e 4, da região coberta por *R. mangle*. Nenhum dos 30 isolados selecionados a partir da região coberta por *Avicennia schaueriana* apresentou a presença do gene *sfp*. Já no manguezal de Icapuí, o gene foi encontrado em 11% dos isolados, mas não foi encontrada diferença significativa entre a ocorrência do gene e as regiões de coleta dentro do manguezal. É importante observar que alguns dos isolados (TIM 10, TIM 68, ICA 24, ICA 32 e ICA 56), positivos para *sfp* já tinham se destacado pela capacidade de produzir emulsão e de redução da tensão superficial, representando, assim, fontes promissoras para a produção de surfactina.

Kim e colaboradores (2000) realizaram a clonagem do gene *sfp* em bactérias previamente não produtoras de surfactina, obtendo após isso, linhagens produtoras do biosurfactante e que passaram a ter a capacidade de emulsionar hidrocarbonetos de cadeia longa. Dessa maneira, os isolados selecionados neste estudo devem desempenhar um importante papel no seu ambiente de origem, particularmente na metabolização de hidrocarbonetos. Dessa forma, ressalta-se o valor dos resultados obtidos nesse trabalho, pois um total de 18 isolados detentores do gene para surfactina foram obtidos podendo esses isolados serem utilizados em aplicações ambientais, que requeiram tensoativos.

Em relação aos genes envolvidos na síntese da iturina, os resultados positivos obtidos para as 200 linhagens estão mostrados na Figura 9.

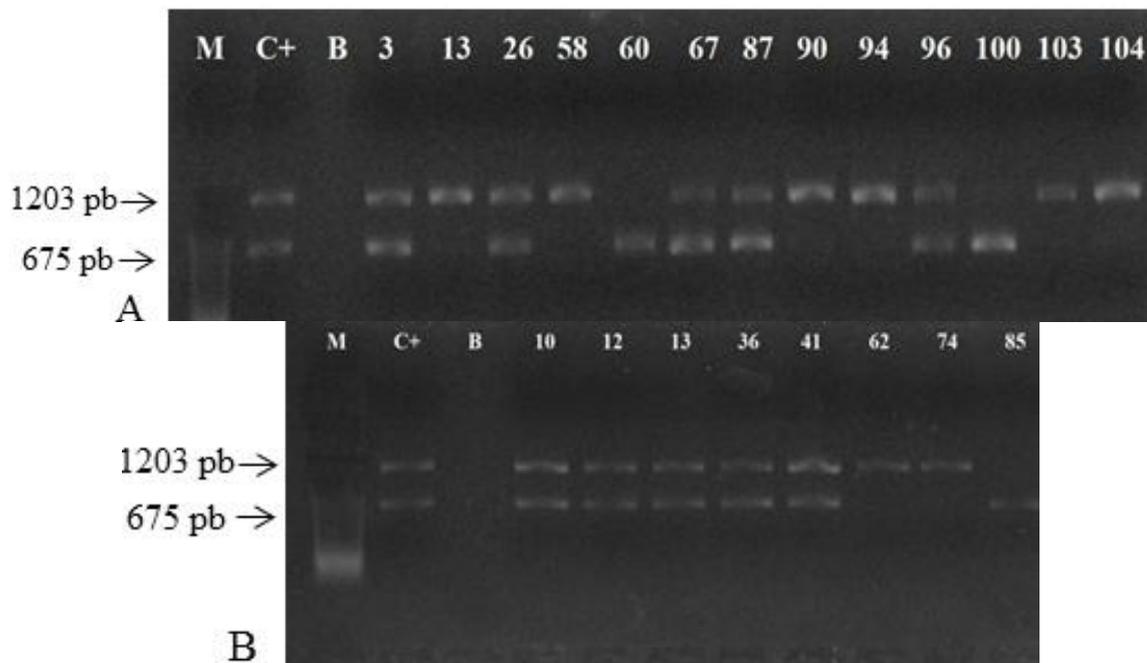


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose (1%) mostrando os isolados positivos de Timonha (A) e de Icapuí (B), para os genes *ituD* e *lpa14*. C⁺ - Controle positivo, *Bacillus* sp. 255 ; B – Branco da reação.

Dos 200 isolados obtidos, a taxa de ocorrência do gene *ituD* foi de 11% para o manguezal de Timonha e de 7% para o manguezal de Icapuí e a do gene *lpa14*, de 7% no manguezal de Timonha e 6% para Icapuí. Da mesma forma como foi observado para o gene *sfp*, alguns desses isolados positivos ou para o gene *ituD* ou para o gene *lpa14* já haviam se destacado nos ensaios de emulsificação e de tensão superficial, sendo eles TIM 3, TIM 13, TIM 94, TIM 96, TIM 100, TIM 104 e ICA 36. Embora ambos os genes sejam descritos como essenciais à produção do lipopeptídeo iturina (HSIEH *et al*, 2008), em alguns casos, os dois não tiveram ocorrência simultânea, como nos isolados TIM 13, TIM 58, TIM 90, TIM 94, TIM 103, TIM 104, ICA 62 e ICA 74, onde foi encontrado apenas o gene *ituD*, e nos isolados TIM 60, TIM 100 e ICA 85, onde foi encontrado apenas o gene *lpa14*. Assim, é

razoável especular que em tais isolados os genes individualmente estejam envolvidos com a produção de outros lipopeptídeos, o que explicaria os resultados de emulsificação e de redução de tensão superficial encontrados. Os resultados foram plotados em gráficos para facilitar a visualização dos potenciais isolados produtores de surfactina (gene *sfp*) e iturina (genes *ituD* e *lpa14*, simultaneamente) de cada manguezal (Figura 10).

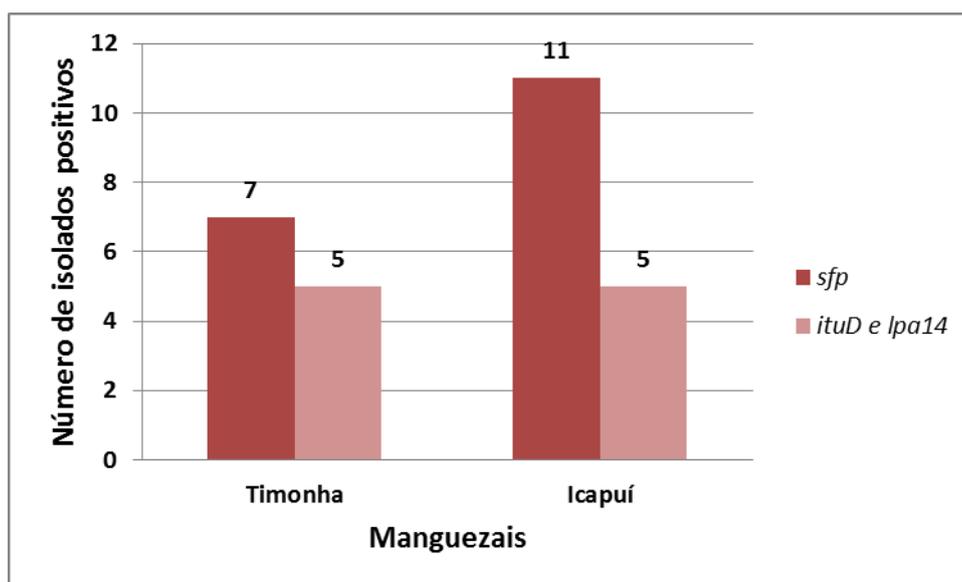


Figura 10 – Taxas de ocorrência dos genes *sfp* e *ituD* e *lpa14* nos 200 isolados selecionados dos manguezais do Timonha e Icapuí.

Os resultados para os três genes estão apresentados no Apêndice C, onde é possível constatar que em nenhum dos 200 isolados há a produção simultânea de surfactina e de iturina (determinada pela presença dos genes *ituD* e *lpa14* simultaneamente), o que demonstra que a estratégia experimental desse estudo detectou diferentes populações de bactérias produtoras de lipopeptídeos.

Na Tabela 3 é possível visualizar os resultados moleculares positivos obtidos juntamente com os resultados dos ensaios de emulsificação e de tensões superficiais discutidos anteriormente. Os valores dos ensaios de emulsificação e de redução da tensão superficial considerados mais significativos e as amplificações positivas para surfactina e iturina encontram-se marcados em amarelo.

Tabela 3 – Resumo das atividades tensoativas e da presença dos genes *sfp*, *ituD* e *lpa14* de isolados bacterianos selecionados a partir de amostras de sedimentos dos manguezais Timonha e Icapuí.

Isolados	Média do E24 com as células	Média do E24 com os sobrenadantes	Valor de redução da tensão %	<i>sfp</i>	<i>ItuD + lpa14</i>
TIM 3	6,5 ± 4,0	56 ± 0	52% ± 0%	-	+
TIM 10	6 ± 0	63 ± 0	54% ± 1%	+	-
TIM 17	39,5 ± 4,0	60 ± 0	44% ± 1%	+	-
TIM 26	0 ± 0	16 ± 0	38% ± 5%	-	+
TIM 27	60 ± 0	0 ± 0	48% ± 0%	+	-
TIM 58	34,75 ± 3,5	25 ± 1,7	48% ± 1%	+	-
TIM 61	23 ± 1,5	60 ± 0	49% ± 1%	+	-
TIM 63	35 ± 5,7	43 ± 0	49% ± 1%	+	-
TIM 67	0 ± 0	8 ± 0,9	50% ± 2%	-	+
TIM 68	0 ± 0	60 ± 0	50% ± 0%	+	-
TIM 87	0 ± 0	60 ± 0	43% ± 0%	-	+
TIM 96	0 ± 0	56 ± 0	52% ± 0%	-	+
ICA 9	17 ± 1,1	60 ± 0	45% ± 0%	+	-
ICA 10	0 ± 0	0 ± 0	47% ± 0%	-	+
ICA 12	13 ± 0	61,5 ± 1,7	48% ± 0%	-	+
ICA 13	10 ± 0	58 ± 5,7	48% ± 1%	-	+
ICA 24	50 ± 1,1	64,5 ± 3,0	52% ± 0%	+	-
ICA 32	9,5 ± 4,0	63 ± 0	51% ± 1%	+	-
ICA 36	0 ± 0	63 ± 3,4	50% ± 0%	-	+
ICA 41	0 ± 0	66 ± 0	42% ± 0%	-	+
ICA 44	37 ± 2	8,25 ± 5,6	31% ± 1%	+	-
ICA 56	36 ± 0	63 ± 0	52% ± 0%	+	-
ICA 60	10 ± 1,1	0 ± 0	27% ± 0%	+	-
ICA 74	0 ± 0	8 ± 0,9	40% ± 5%	+	-
ICA 75	16 ± 0	60 ± 0	43% ± 0%	+	-
ICA 81	6 ± 0	61,5 ± 1,73	44% ± 1%	+	-
ICA 82	20 ± 0	5 ± 5,7	42% ± 0%	+	-
ICA 86	50 ± 0	36 ± 0	33% ± 0%	+	-

Com base nos dados da tabela, supõe-se que os genes detectados estejam sendo expressos uma vez que, com poucas exceções, os isolados positivos para os genes estudados se destacaram em pelo menos uma das atividades pesquisadas.

Stanković e colaboradores (2012) realizaram uma seleção de 205 bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, isoladas de diversos ambientes, tendo por base a presença de genes envolvidos na síntese de lipopeptídeos como bacilomicina D, surfactina, iturina, fengicina. Destes, 81% apresentaram o gene necessário para a síntese de bacilomicina D, 54% foram positivos para a surfactina, 38% para iturina e 25% para fengicina. O estudo também constatou que a maior parte dos isolados testados foi capaz de produzir mais de um dos lipopeptídeo pesquisados. Comparando com os dados obtidos no presente trabalho, podemos supor que muitos dos micro-organismos selecionados como produtores de surfactina ou iturina possam ser capazes também de produzir outros biossurfactantes.

5.3 Atividade dispersante do óleo com as linhagens promissoras

De acordo com Ramkrishna (2010), contaminações dos mares e costas com hidrocarbonetos provenientes de acidentes de vazamentos é um problema mundial e esses óleos podem persistir no ambiente marinho por muitos anos após um derramamento de óleo, podendo atingir áreas costeiras, como restingas e mangues. Tendo em vista a susceptibilidade do ecossistema manguezal, as bactérias positivas para pelo menos um dos três genes pesquisados foram testadas quanto à suas capacidades para dispersar óleos. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 11.

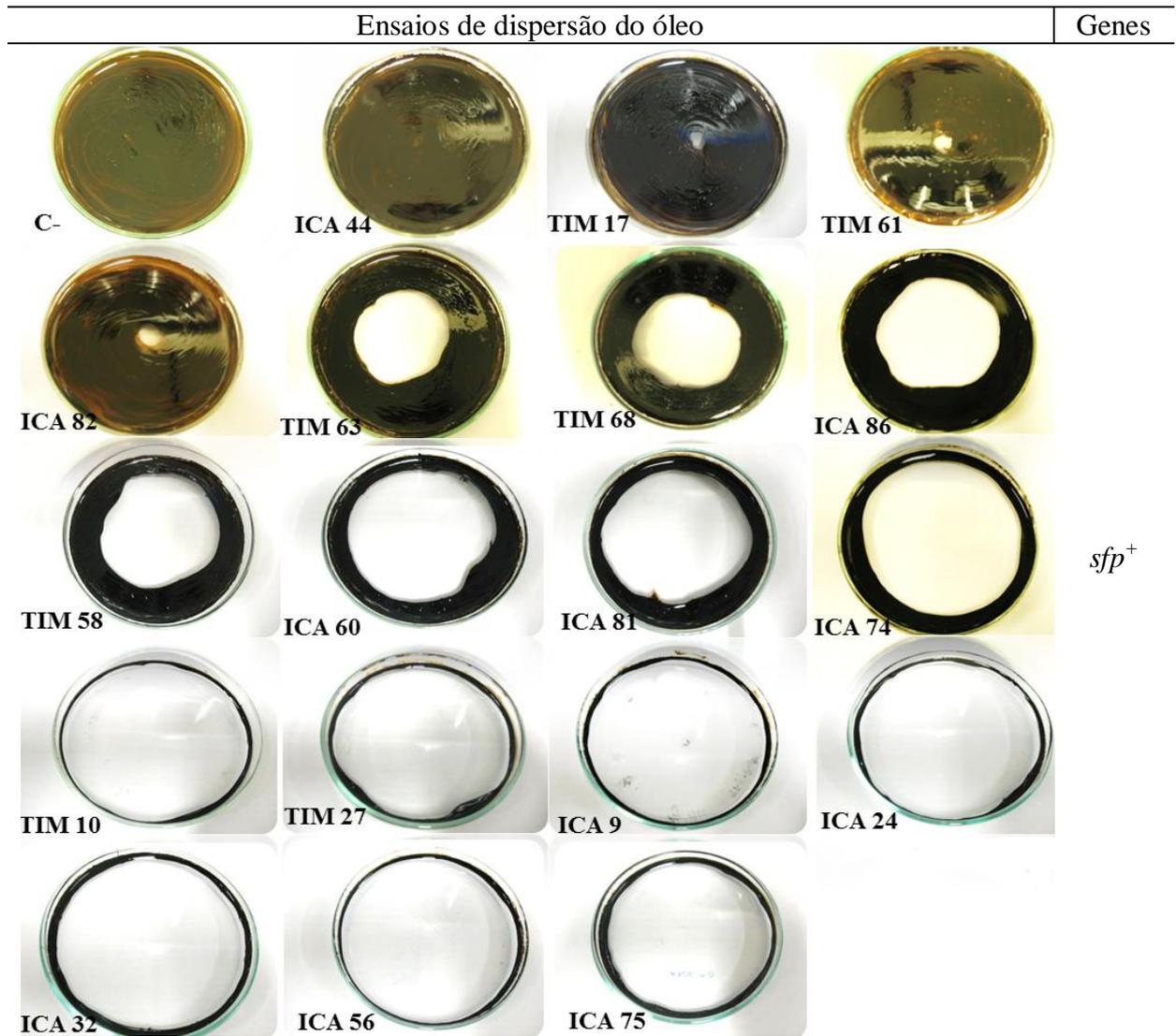


Figura 11a - Dispersão de óleo produzida por culturas de isolados bacterianos selecionados a partir de sedimentos dos manguezais do Timonha e Icapuí, agrupados de acordo com a presença do gene para surfactina (*sfp*).

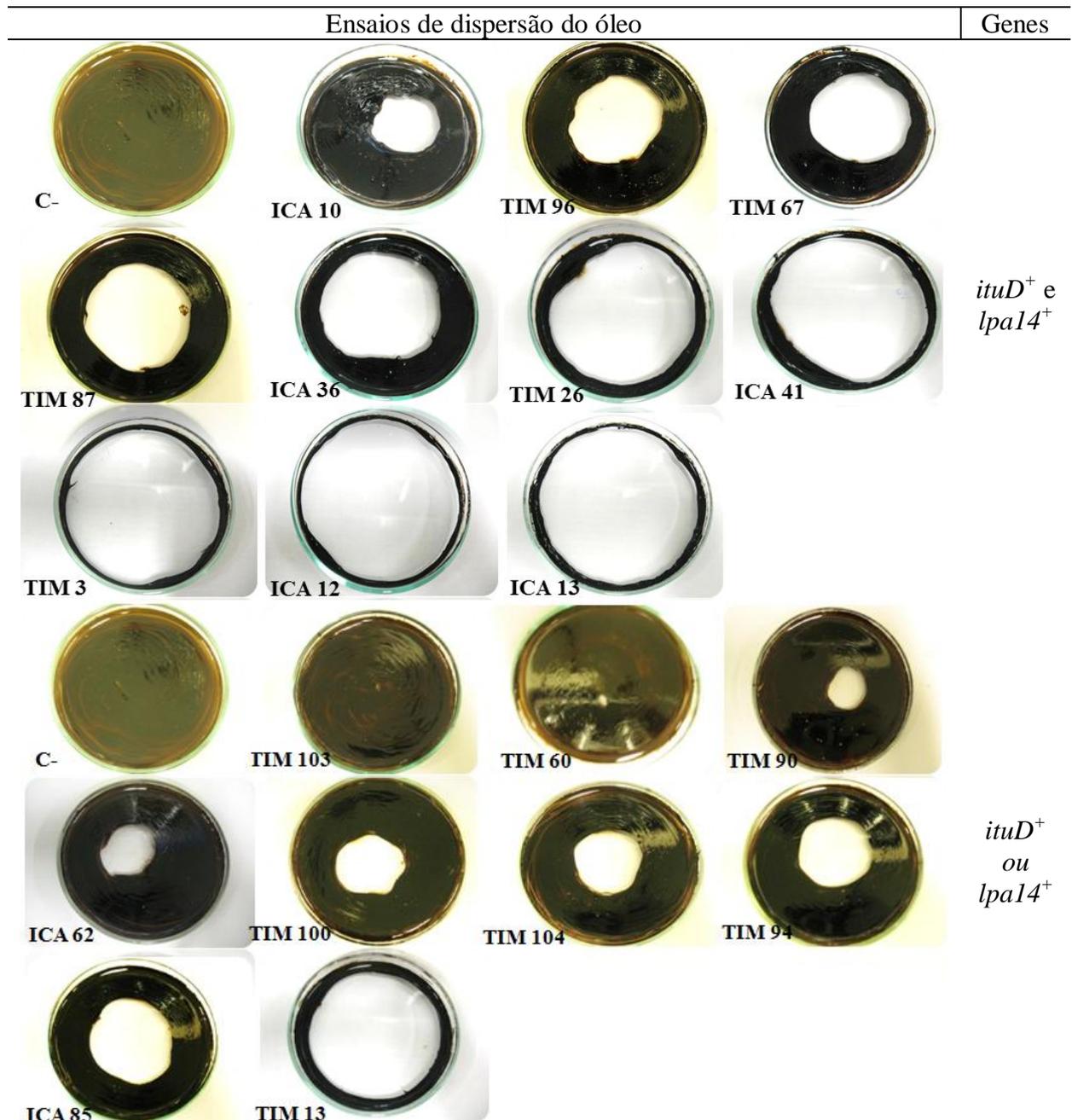


Figura 11b - Dispersão de óleo produzida por culturas de isolados bacterianos selecionados a partir de sedimentos dos manguezais do Timonha e Icapuí, agrupados de acordo com a presença dos genes para iturina conjuntamente (*ituD* e *lpa14*) ou para apenas um dos dois genes, *ituD* ou *lpa14*.

Os resultados observados no ensaio de dispersão de óleo revelaram biossurfactantes promissores, muitos dos quais promoveram a formação de halos equivalentes ao diâmetro da placa utilizada. Destes, sete possuem o gene *sfp* (isolados TIM 10, TIM 27, ICA 9, ICA 24, ICA 32, ICA 56 e ICA 75) e cinco possuem ambos os genes da iturina (isolados TIM 3, TIM 26, ICA 12, ICA 13 e ICA 41). Dos isolados que apresentaram apenas um dos genes necessários à síntese da iturina, TIM13 merece destaque, por ter apresentado uma excelente

atividade dispersante, apresentando apenas o gene *ituD*. Com base na literatura, ambos *ituD* e *lpa14* são necessários para a produção da iturina A (HSIEH *et al*, 2008; LIN, TSANG & LIU, 2011), o que nos leva a supor que, nesse caso, outro lipopeptídeo esteja sendo sintetizado, sendo responsável pela atividade dispersante exibida.

É interessante ressaltar que o ensaio de dispersão foi realizado com os sobrenadantes brutos da cultura e com uma espessa camada de óleo derramado, o que demonstra o grande potencial dos isolados positivos para aplicações práticas de limpeza de óleo da água.

Carvalho (2012) estudou 66 isolados bacterianos quanto à produção de biossurfactantes e, para tanto, utilizou a metodologia da dispersão do óleo, utilizando 100 µl de óleo diesel, para identificar as bactérias mais promissoras. Como resultado, encontrou que todas as linhagens apresentaram a produção de algum halo de dispersão, mas apenas 17 (equivalente a 25%) foram capazes de gerar halos com o diâmetro total da placa de Petri. No presente trabalho, dos 37 isolados testados, apenas dois não apresentaram atividade de dispersão de óleo e treze (equivalente a 35%) demonstraram potencial para gerar halos do tamanho máximo permitido. É importante salientar também que no presente trabalho, o ensaio foi realizado com uma quantidade significativamente maior de óleo (0,25 g) do que o usado por Carvalho (2012).

Chandrasekar, Sorial e Weaver (2006) salientaram a influencia da salinidade na atividade dispersante. Em geral, maiores salinidades tendem a favorecer a ação de dispersantes, o que sugere que, em situações reais de derrames de óleo no meio marinho, os dispersantes estudados teriam um desempenho ainda melhor do que o observado.

Youssef e colaboradores (2004) avaliaram a confiabilidade do método de espalhamento do óleo e o indicaram como um excelente método para a busca por bactérias produtoras de biossurfactantes, estando relacionado com a capacidade de redução da tensão superficial. Além disso, a redução da tensão superficial está limitada à CMC da molécula, pois depois de atingida essa concentração, não há diminuição no valor da tensão. Por outro lado, o ensaio de dispersão do óleo não está limitado ao valor da CMC, de forma que halos maiores são formados conforme maiores sejam as concentrações do biossurfactante.

É importante ressaltar também que todos os sobrenadantes utilizados foram previamente submetidos à autoclavagem a 121 °C/15 minutos. Dessa forma, as áreas limpas observadas na Figura 9 foram formadas por moléculas resistentes a altas temperaturas, o que torna os resultados ainda mais interessantes do ponto de vista de aplicações ambientais e/ou industriais.

5.4 Concentração da produção de biossurfactante com as linhagens promissoras

Morikawa, Hirata e Imanaka (2000) relataram que a área limpa observada no ensaio de dispersão do óleo é diretamente proporcional à concentração do biossurfactante na solução. Dessa maneira, 16 dos isolados positivos para pelo menos um dos genes testados, além de terem sido avaliados quanto ao potencial para dispersar o óleo, tiveram também seus biossurfactantes extraídos para avaliação da sua concentração de produção (Figura 12).

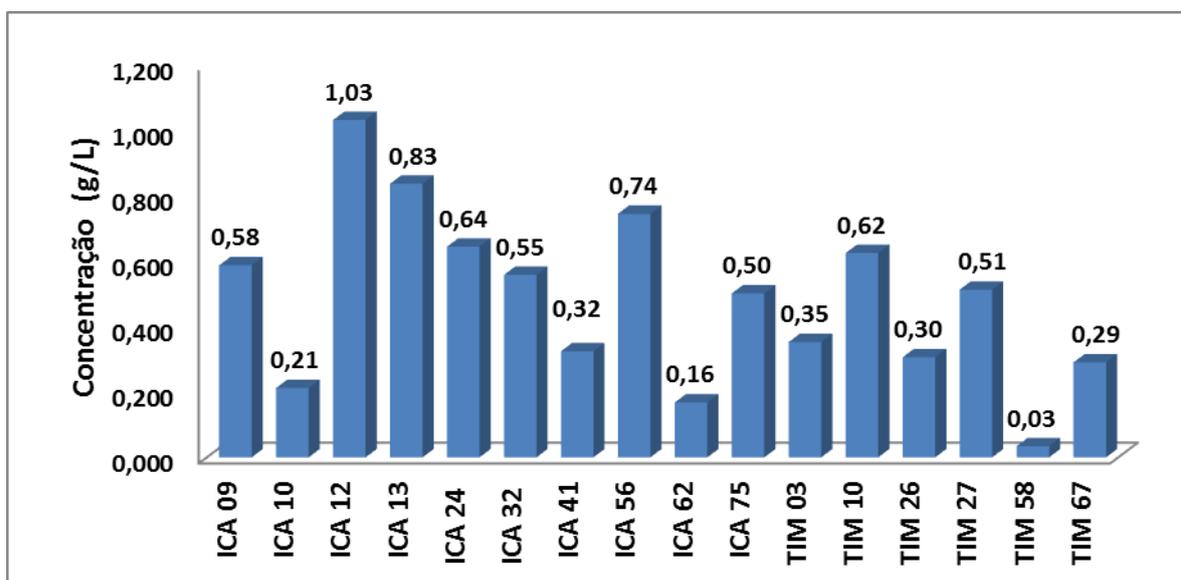


Figura 12 – Concentração de biossurfactantes produzidos pelas culturas de bactérias que apresentaram a presença de pelo menos um dos genes pesquisados.

Com base nas concentrações obtidas, destaca-se ICA12 como muito promissora, capaz de produzir mais de 1 g/L de biossurfactante nas condições do cultivo, sem nenhum ajuste para aumentar a produção.

Saimmai, Sobhlon e Maneerat (2012b) testaram diferentes fontes de carbono como substratos para a produção de biossurfactante por um isolado de *Leucobacter komagatae*. Dentre as fontes de carbono testadas, encontram-se: açúcar comercial, glicose, glicerol, molasse, óleo de lubrificação usado, entre outros. De acordo com os rendimentos obtidos, as melhores fontes de carbono para a produção dos biossurfactantes por esse isolado foram o açúcar comercial e a glicose, com os respectivos rendimentos de 0,7 e 0,6 g/L. Comparando com os resultados obtidos no presente trabalho, onde foi utilizado glicose como fonte de carbono no meio de cultura, os isolados ICA 12, ICA 13, ICA 24, ICA 56 e TIM 10 apresentaram valores mais elevados do que os obtidos por esses autores com a mesma fonte

de carbono, demonstrando excelente potencial para a produção do biossurfactante de interesse.

Oliveira (2010) estudou a produção da surfactina por uma linhagem de *Bacillus subtilis*. Sabendo que as condições de cultivo são determinantes para a produção dos metabólitos, a autora também verificou alterações nos rendimentos frente à variações nas concentrações da fonte de carbono, e o rendimento máximo obtido foi de 0,372 g/L, após 48 horas de cultivo. Dessa maneira, chama-se atenção para linhagens como ICA 09, ICA 12, ICA 13, ICA 24, ICA 32, ICA 56, ICA 75, TIM 10 e TIM 27, que apresentaram concentrações superiores a 0,5 g/L. Supõe-se que estudos acerca do rendimento da produção do biossurfactante de interesse, submetendo os isolados à diferentes condições de cultivo, variando, por exemplo, a fonte de carbono, de nitrogênio, velocidade de agitação da cultura, temperatura do crescimento, entre outros, possam propiciar rendimentos ainda mais altos.

Comparando os resultados aqui obtidos com a literatura citada, obteve-se no presente estudo uma seleção de excelente qualidade, realizado com métodos de detecção de alta confiabilidade, onde foram encontradas diversas linhagens promissoras para a produção de biossurfactantes, que se destacaram de maneiras distintas para as atividades testadas. Os dados sugerem uma riqueza de espécies produtoras de lipopeptídeos em sedimentos de manguezais, considerando que foram encontrados vários isolados produtores de surfactina, de iturina e, possivelmente, outros lipopeptídeos.

Não foram observadas diferenças significativas entre os dois manguezais que sugerisse uma correlação positiva entre a ocorrência de produtores de surfactantes lipopeptídeos com o grau de contaminação do manguezal. Embora Icapuí seja um manguezal mais antropizado do que o Timonha, com uma grande atividade de barcos pesqueiros que usam óleo diesel como combustível, e que, portanto, poluem a água e sedimentos, além de situar-se numa região considerada vulnerável, devido à atividade de extração de petróleo, os dois manguezais apresentaram frequências similares de cepas produtoras de lipopeptídeos surfactantes.

6 Conclusão

O estudo da frequência de isolados bacterianos produtores de surfactantes lipopeptídeos em sedimentos de dois manguezais do Ceará levou à obtenção de 200 isolados, com 65 deles se destacando pela produção de biossurfactantes, uma frequência de 32,5%. Desses, 18 são produtores de surfactina e 10 são produtores de iturina. Treze isolados se destacaram pela excelente capacidade de dispersar óleo derramado em água. Não se observou diferença significativa entre a riqueza de produtores de surfactantes e o grau de impacto dos manguezais estudados ou aos diferentes habitats analisados dentro dos manguezais. Embora a hipótese do trabalho não tenha sido confirmada, os resultados ressaltaram a importância dos manguezais como fonte de bactérias produtoras de biossurfactantes lipopeptídeos, e sugerem um papel constitutivo dessas moléculas nas populações produtoras.

7 Referências Bibliográficas

- ALONGI, D.M. Mangrove Forest: Resilience, protection from tsunamis, and responses to global climate change. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 76, p.1-13, 2008.
- BAKER, J. Dispersants and Their Role in Oil Spill Response. International Petroleum Industry Environmental Conservation Association (**IPIECA**), 2001.
- BARRETO, R.V.G.; HISSA, D.C.; PAES, F.A.; GRANGEIRO, T.B.; NASCIMENTO, R.F.; REBELO, L.N.; CRAVEIRO, A.A.; MELO, V.M.M. New approach for petroleum hydrocarbon degradation using bacterial spores entrapped in chitosan beads. **Bioresource Technology**, v.101, p. 2121-2125, 2010.
- BRASIL. Lei Federal nº 4.771 de 15 de setembro de 1965. Institui o Código Florestal Brasileiro. Publicada no Diário Oficial da União em 16 de setembro de 1965, Brasília/DF, 1965.
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução nº 303 de 20 de março de 2002. Dispõe sobre parâmetros, definições e limites de Áreas de Preservação Permanente. Publicada no Diário Oficial da União em 13 de maio de 2002, Brasília/DF, 2002.
- CARVALHO, L.C.T. Produção de lípases e biossurfactantes por bactérias isoladas de um sedimento contaminado com óleo vegetal residual. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal de Pernambuco, 2012.
- CHANDRASEKAR, S.; SORIAL, G.A.; WEAVER, J.W. Dispersant effectiveness on oil spills – impact of salinity. **ICES Journal of Marine Science**, v. 63, p. 1418-1430, 2006.
- DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strain in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: some industrial applications of biosurfactants. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1191-1199, 2007.

- DIAS, A. C. F. Diversidade de bactérias do sedimento de manguezal da Ilha do Cardoso-Cananéia – São Paulo. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- GIRI, C; OCHIENG, E.; TIESZEN, L.L.; ZHU, Z.; SINGH, A; LOVELAND, T.; MASEK, J.; DUKE, N. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. **Global Ecology and Biogeography**, v. 20, p. 154-159, 2011.
- GIRO, M.E.A.; MARTINS J.J.L.; ROCHA M.V.P.; MELO V.M.M.; GONCALVES L.R.B.; Clarified cashew apple juice as alternative raw material for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in a batch bioreactor. **Biotechnology Journal**, v. 4, p.738–747, 2009.
- HAMED, S.B.; SMII, L.; GHRAM, A.; MAAROUFI, A. Screening of potential biosurfactant-producing bacteria isolated from seawater biofilm. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 14153-14158, 2012.
- HANSON, C.A.; FUHRMAN, J.A.; HORNER-DEVINE, C.H.; MARTINY, J.B.H. Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. **Nature reviews**, v.10, 2012.
- HOA, N.T., BACCIGALUPI, L., HUXHAM, A., SMERTENKO, A., VAN, P.H., AMMENDOLA, S., RICCA, E., CUTTING, S.M. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. **Applied Environmental Microbiology**. v. 66, p. 5241-5247, 2000.
- HONG, H.A.; TO, E.; FAKHRY, S.; BACCIGALUPI, L.; RICCA, E.; CUTTING, S.M. Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers. **Research in Microbiology**, v. 160, p. 375-379, 2009.
- HSIEH F.C.; LI M.C.; LIN T.C.; KAO S.S. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. **Current Microbiology** v.49; p.186–191, 2004.

- HSIEH F.C.; LIN T.C.; MENG, M.; KAO S.S. Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide Iturin A. **Current Microbiology**, v.56; p.1–5, 2008.
- HUE, N.; SEMNI, L.; LAPREVOTE, O. Structural investigation of cyclic peptidolipids from *Bacillus subtilis* by high energy tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 15, p. 203-209, 2001.
- IQBAL, S.; KHALID, Z. M.; MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyper production of biosurfactant by gamma ray - induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, p.176-179, 1995.
- JACQUES, P.; HBID,C.; DESTAIN, J.; RAZAFINDRALAMBO, H.; PAQUOT, M. PAUW, E.D.; THONART, P. Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 BY Plackett-Burman design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, 1999.
- KATHIRESAN, K; SANDILYAN, S. Mangrove conservation: a global perspective. **Biodiversity and Conservation**, v.21, p.3523-3542, 2012.
- KIM, H.S.; KIM, S.B.; PARK, S.H.; OH, H.M.; PARK, Y.I.; KIM, C.K.; KATSURAGI, T.; TANI, Y.; YOON, B.D. Expression of *sfp* gene and hydrocarbon degradation by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, v. 22, p.1431-1436, 2000.
- KREPSKY, N.; DA SILVE, F.S.; FONTANA, L.F.; CRAPEZ, M.A.C. Alternative methodology for isolation of biosurfactant-producing bacteria. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, p. 117-124, 2007.
- KRUITWAGEN, G.; NAGELKERKEN, I.; LUGENDO, B.R.; MGAYA Y.D.; BONGA, S.E.W. Importance of different carbon sources for macroinvertebrates and fishes of an interlinked mangrove mudflat ecosystem (Tanzania). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 88, 2010.
- LI, M.; HONG, Y.G.; CAO, H.L.; GU, J.D. Mangrove trees affect the community structure and distribution of anammox bacteria at an anthropogenic-polluted mangrove in the Pearl River

Delta reflected by 16S rRNA and hydrazine oxidoreductase (HZO) encoding gene analyses. **Ecotoxicology**, v.20, p. 1780-1790, 2011.

LIN, H.F.; TSANG, H.C.; LIU, S.D. The antifungal mechanism of *Bacillus subtilis* against *Pestalotiopsis eugeniae* and its development for commercial applications against wax apple infection. **African Journal of Microbiology Research**, v.5 (14), p. 1723-1228, 2011.

LOTTA, G.; MARTINS, R. Estudo da continuidade dos projetos educacionais do município de Icapuí. **Cadernos Gestão Pública e Cidadania**, v. 26, 2003.

MEIRELES, A. J. A.; CASSOLA, R. S.; TUPINAMBA, S. V.; QUEIROZ, L. S. Impactos ambientais decorrentes das atividades da carcinicultura ao longo do litoral cearense, nordeste do Brasil. **Mercator**, ano 06, n.12, 2007.

MORÁN, A. C.; OLIVEIRA, N.; COMMENDATORE, M.; ESTEVES, J. L.; SENERIZ, F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. **Biodegradation**, v.11 (1), p.65-71, 2000.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1488, p. 211-218, 2000.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

NAKANO, M.M.; CORBELL, N.; BESSON, J.; ZUBER, P. Isolation and characterization of *sfp*: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. **Molecular and General Genetics**, v. 232, p. 313-321, 1992.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, No. 5, p. 772-776, 2002.

OLIVEIRA, D.W.F. Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

ONAIZI, S.A.; NASSER, M.S.; TWAIQ, F.A. Micellization and interfacial behavior of a synthetic surfactant-biosurfactant mixture. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 415, p. 388-393, 2012.

PACWA-PLOCINICZAK, M.; PLAZA, G.A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S.S. Environmental applications of biossurfactantes: recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, p. 633-654, 2011.

RAMKRISHNA, S. Biosurfactants. Springer Science & Business Media, 2010.

RON, E.Z. & ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v.3, p. 229-236, 2001.

SAIMMAI, A.; TANI, A.; SOBHLON, V. MANEERAT, S. Mangrove sediment, a new source of potential biosurfactant-producing bacteria. **Annals of Microbiology**, v. 62, p.1669-1679, 2012a.

SAIMMAI, A.; SOBHLON, V. MANEERAT, S. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Leucobacter komagatae* 183. **Annals of Microbiology**, v.62, p. 391-402, 2012b.

SAKHO, I.; MESNAGE, V.; DELOFFRE, J.; LAFITE, R.; NIANG, I.; FAYE, G. The influence of natural and anthropogenic factors on mangrove dynamics over 60 years: The Somone Estuary, Senegal. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 94, p. 93-101, 2011.

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 Pollution**, v. 216, p. 329-350, 2011.

- SATPUTE, S.K.; BANAT, I.M.; DHAKEPHALKAR, P.K.; BANPURKAR, A.G.; CHOPADE, B.A. Biosurfactantes, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology Advances**, v.28, p.436-450, 2010.
- SCHAEFFER-NOVELLI Y.; CINTRON, G. Status of mangrove research in Latin America and the Caribbean. **Boletim do Instituto de Oceanografia**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 93-97, 1990.
- SCHMIDT, T.M. The maturing of microbial ecology. **International Microbiology**, v.9, p. 217-223, 2006.
- SILVA, E.V. & SOUZA, M.M.A. Principais formas de uso e ocupação dos manguezais do Estado do Ceará. **Cadernos de Cultura e Ciência**, v. 1 - Nº 1, 2006.
- STANKOVIĆ, S.; MIHAJLOVIĆ, S.; DRAGANIĆ, D.; DIMKIĆ, I.; VUKOTIĆ, G.;BERIĆ, T.; FIRA, D. Screening for the presence of biosynthetic genes for antimicrobial lipopeptides in natural isolates od *Bacillus* sp. **Archives of Biological Sciences**, v. 64, p. 1425-1432, 2012.
- STEINBÜCHEL, A. Biosurfactants: From genes to applications. Springer, 2011.
- SPALDING, M; KAINUMA, M; COLLINGS, M.K.L. World atlas of mangroves. Earthscan, Londres, 2010.
- THAVASI, R.; SHARMA, S.; JAYALAKSHMI, S. Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. **Petroleum & Environmental Biotechnology**, 2011.
- TORSVIK, V; DAAE, F.L.; SANDAA, R.A.; OVREAS, L. Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal og Biotechnology**, v.64, p. 53-62, 1998.
- WARNER, S. A. J. Genomic DNA Isolation and Lambda Library Construction, em: Gary D. Foster and David Twell, Plant Gene Isolation, England, p. 56-58, 1996.

WEI, Y. H.; CHU, I. M. Mn^{2+} improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 479-482, 2002.

WILLUMSEN P.A.; KARLSON U. Screening of bacteria isolated from PAH-contaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation** v. 7, p. 415–423, 1997.

YEH, M. S.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Addition of Solid Carriers. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1329-1334, 2005.

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.

ZHU, X., VENOSA, A. D., SUIDAN, M. T., & LEE, K. Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater wetlands. Cincinnati: U.S. Environmental Protection Agency, 2001.

8 Apêndices

APÊNDICE A - Pontos de coleta georeferenciados dos dois manguezais estudados.

	Timonha	Icapuí
1	-2° 56' 35.23'', -41° 19' 3.83''	-4° 41' 27.96'', -37° 21' 5.64''
2	-2° 56' 35.77'', -41° 19' 4.33''	-4° 41' 28.98'', -37° 21' 5.52''
3	-2° 56' 35.12'', -41° 19' 4.37''	-4° 41' 30.06'', -37° 21' 5.10''
4	-2° 56' 33.86'', -41° 19' 3.79''	-4° 41' 31.02'', -37° 21' 5.58''
5	-2° 56' 34.01'', -41° 19' 3.58''	-4° 41' 31.74'', -37° 21' 5.58''
6	-2° 56' 33.04'', -41° 19' 4.15''	-4° 41' 31.32'', -37° 21' 8.40''
7	-2° 56' 33.79'', -41° 19' 4.51''	-4° 41' 30.30'', -37° 21' 8.52''
8	-2° 56' 34.84'', -41° 19' 4.62''	-4° 41' 29.46'', -37° 21' 8.22''
9	-2° 56' 33.65'', -41° 19' 5.09''	-4° 41' 29.04'', -37° 21' 7.68''
10	-2° 56' 32.64'', -41° 19' 4.55''	-4° 41' 27.60'', -37° 21' 7.44''
11	-2° 56' 33.40'', -41° 19' 4.55''	-4° 41' 26.40'', -37° 21' 11.16''
12	-2° 56' 35.88'', -41° 19' 6.24''	-4° 41' 27.66'', -37° 21' 11.88''
13	-2° 56' 34.62'', -41° 19' 6.24''	-4° 41' 28.98'', -37° 21' 12.60''
14	-2° 56' 35.38'', -41° 19' 5.52''	-4° 41' 29.94'', -37° 21' 12.90''
15	-2° 56' 34.65'', -41° 19' 3.95''	-4° 41' 30.12'', -37° 21' 13.62''

APÊNDICE B – Resultados dos ensaios de E24 realizados com as células e com os sobrenadantes, juntamente com os valores de tensão superficial para os 200 isolados.

Isolados	Média do E24 com as células	Média do E24 com os Sobrenadantes	Valor de redução da tensão %
TIM 1	16 ± 0	33 ± 0	21% ± 3%
TIM 2	18,75 ± 3,4	0 ± 0	18% ± 1%
TIM 3	6,5 ± 4,0	56 ± 0	52% ± 0%
TIM 4	6 ± 0	0 ± 0	53% ± 0%
TIM 6	19,75 ± 2,8	34,5 ± 2,4	47% ± 4%
TIM 7	0 ± 0	13 ± 0	33% ± 4%
TIM 8	23 ± 1,1	0 ± 0	33% ± 3%
TIM 9	6 ± 0	63 ± 0	53% ± 0%
TIM 10	6 ± 0	63 ± 0	54% ± 1%
TIM 11	12,25 ± 2,8	0 ± 0	52% ± 2%
TIM 12	33 ± 0	24 ± 4,2	34% ± 5%
TIM 13	0 ± 0	65,25 ± 1,5	52% ± 0%
TIM 14	33 ± 0	56 ± 0	48% ± 2%
TIM 15	44,5 ± 1,7	0 ± 0	39% ± 3%
TIM 16	3 ± 0	50 ± 0	42% ± 2%
TIM 17	39,5 ± 4,0	60 ± 0	44% ± 1%
TIM 18	33 ± 0	0 ± 0	47% ± 2%
TIM 21	16 ± 0	16 ± 0	32% ± 4%
TIM 22	23 ± 0	33 ± 1,1	20% ± 4%
TIM 23	8 ± 0,9	8 ± 0,9	18% ± 0%
TIM 24	0 ± 0	16 ± 0	27% ± 0%
TIM 25	19,5 ± 4,0	37 ± 0	30% ± 2%
TIM 26	0 ± 0	16 ± 0	38% ± 5%
TIM 27	60 ± 0	0 ± 0	48% ± 0%
TIM 29	40 ± 0	0 ± 0	31% ± 1%
TIM 30	10 ± 0	21,5 ± 2,4	30% ± 4%
TIM 31	6,5 ± 0,7	0 ± 0	20% ± 0%
TIM 32	20 ± 0	0 ± 0	13% ± 6%
TIM 33	33 ± 0	60 ± 0	50% ± 0%
TIM 34	0 ± 0	33 ± 0	43% ± 4%
TIM 35	0 ± 0	43 ± 8,0	9% ± 5%
TIM 36	16 ± 0	50 ± 0	32% ± 2%
TIM 37	13 ± 0	0 ± 0	33% ± 3%
TIM 39	0 ± 0	0 ± 0	51% ± 1%
TIM 40	13 ± 0	36,5 ± 4,0	52% ± 0%
TIM 41	6,5 ± 7,5	0 ± 0	38% ± 2%
TIM 42	0 ± 0	23 ± 1,1	48% ± 3%
TIM 43	43 ± 0	26,25 ± 4,7	39% ± 3%
TIM 44	14,5 ± 1,7	13 ± 0	33% ± 4%

Isolados	Média do E24 com as células	Média do E24 com os Sobrenadantes	Valor de redução da tensão %
TIM 45	32 ± 4,2	20 ± 1,1	31% ± 1%
TIM 46	0 ± 0	0 ± 0	25% ± 2%
TIM 47	11,5 ± 1,3	15 ± 1,7	28% ± 5%
TIM 48	19,5 ± 4,0	51,5 ± 1,7	29% ± 1%
TIM 49	60 ± 0	54,5 ± 1,7	51% ± 1%
TIM 51	5 ± 5,7	0 ± 0	9% ± 5%
TIM 52	11,5 ± 1,3	0 ± 0	46% ± 5%
TIM 53	33 ± 0	0 ± 0	30% ± 5%
TIM 54	0 ± 0	23 ± 0	48% ± 1%
TIM 55	21,5 ± 5,1	33 ± 0	18% ± 3%
TIM 56	12,5 ± 5	60 ± 0	42% ± 0%
TIM 57	13 ± 0	0 ± 0	26% ± 3%
TIM 58	34,75 ± 3,5	25 ± 1,7	48% ± 1%
TIM 59	29,5 ± 4,0	60 ± 0	48% ± 0%
TIM 60	30,75 ± 1,5	20 ± 0	44% ± 3%
TIM 61	23 ± 1,5	60 ± 0	49% ± 1%
TIM 62	0 ± 0	0 ± 0	46% ± 3%
TIM 63	35 ± 5,7	43 ± 0	49% ± 1%
TIM 64	10 ± 0	43 ± 0	47% ± 0%
TIM 65	20 ± 0	53 ± 3,4	38% ± 4%
TIM 66	6 ± 0	26,25 ± 5,3	43% ± 2%
TIM 67	0 ± 0	8 ± 0,9	50% ± 2%
TIM 68	0 ± 0	60 ± 0	50% ± 0%
TIM 69	46 ± 0	39,75 ± 1,2	44% ± 3%
TIM 70	20 ± 0	21,5 ± 1,3	32% ± 4%
TIM 71	20 ± 0	50 ± 0	28% ± 2%
TIM 72	50 ± 0	50 ± 0	30% ± 2%
TIM 73	33 ± 0	0 ± 0	23% ± 1%
TIM 74	53 ± 0	21,5 ± 1,3	23% ± 2%
TIM 75	41,5 ± 0,9	43 ± 0	30% ± 0%
TIM 76	20 ± 0	0 ± 0	27% ± 2%
TIM 77	0 ± 0	53 ± 0	45% ± 2%
TIM 80	30 ± 0	50 ± 0	48% ± 1%
TIM 81	0 ± 0	66 ± 0	44% ± 1%
TIM 82	43,25 ± 4,7	2,5 ± 2,8	28% ± 1%
TIM 83	26,25 ± 2,8	49 ± 4,2	29% ± 1%
TIM 84	47 ± 4,2	51,5 ± 1,7	26% ± 1%
TIM 85	38 ± 6,2	16,5 ± 7,5	20% ± 2%
TIM 86	30,5 ± 3,3	46 ± 0	24% ± 1%
TIM 87	0 ± 0	60 ± 0	43% ± 0%
TIM 88	38,75 ± 3,4	11,5 ± 1,7	41% ± 1%

Isolados	Média do E24 com as células	Média do E24 com os Sobrenadantes	Valor de redução da tensão %
TIM 89	0 ± 0	0 ± 0	38% ± 3%
TIM 90	0 ± 0	60 ± 0	43% ± 0%
TIM 91	36,25 ± 4,7	10 ± 0	46% ± 1%
TIM 92	37,25 ± 6,7	16 ± 0	40% ± 4%
TIM 93	21,5 ± 1,3	21,5 ± 1,3	32% ± 0%
TIM 94	0 ± 0	63 ± 0	50% ± 0%
TIM 95	33 ± 0	21,5 ± 1,3	46% ± 3%
TIM 96	0 ± 0	56 ± 0	52% ± 0%
TIM 97	27,5 ± 5	0 ± 0	47% ± 2%
TIM 98	26 ± 0	0 ± 0	38% ± 4%
TIM 100	28 ± 5,7	60 ± 0	52% ± 0%
TIM 101	26,5 ± 7,5	0 ± 0	48% ± 2%
TIM 102	20 ± 0	0 ± 0	43% ± 1%
TIM 103	53 ± 0	19,5 ± 4,0	39% ± 3%
TIM 104	0 ± 0	63 ± 3,4	50% ± 0%
TIM 106	33 ± 0	0 ± 0	30% ± 0%
TIM 107	60 ± 0	39 ± 3,4	40% ± 2%
TIM 108	23 ± 0	46 ± 0	28% ± 2%
TIM 109	36 ± 0	0 ± 0	23% ± 3%
TIM 112	0 ± 0	0 ± 0	25% ± 0%
ICA 1	0 ± 0	0 ± 0	16% ± 1%
ICA 2	18,75 ± 5,6	31,5 ± 1,7	5% ± 0%
ICA 3	0 ± 0	40 ± 0	14% ± 1%
ICA 4	0 ± 0	59 ± 2,0	50% ± 0%
ICA 5	6 ± 0	46,5 ± 4,0	36% ± 3%
ICA 6	13,5 ± 2,8	39,5 ± 4,0	16% ± 1%
ICA 7	10 ± 0	0 ± 0	15% ± 0%
ICA 8	8 ± 2,3	0 ± 0	18% ± 1%
ICA 9	17 ± 1,1	60 ± 0	45% ± 0%
ICA 10	0 ± 0	0 ± 0	47% ± 0%
ICA 11	2,5 ± 5,0	0 ± 0	50% ± 0%
ICA 12	13 ± 0	61,5 ± 1,7	48% ± 0%
ICA 13	10 ± 0	58 ± 5,7	48% ± 1%
ICA 14	11 ± 5,7	8 ± 2,3	47% ± 0%
ICA 15	3 ± 3,4	0 ± 0	49% ± 1%
ICA 16	35,75 ± 1,1	31,5 ± 1,7	30% ± 3%
ICA 17	24,5 ± 1,3	30,5 ± 6,6	26% ± 1%
ICA 18	0,75 ± 1,5	0 ± 0	34% ± 1%
ICA 19	38 ± 8,4	31,5 ± 1,7	22% ± 7%
ICA 20	51,5 ± 1,3	32,25 ± 2,8	28% ± 1%
ICA 21	19 ± 1,3	0 ± 0	28% ± 4%

Isolados	Média do E24 com as células	Média do E24 com os Sobrenadantes	Valor de redução da tensão %
ICA 22	0 ± 0	0 ± 0	50% ± 0%
ICA 23	0 ± 0	0 ± 0	49% ± 1%
ICA 24	50 ± 1,1	64,5 ± 3,0	52% ± 0%
ICA 25	37 ± 2,0	30,5 ± 3,3	37% ± 4%
ICA 26	27,75 ± 5,6	0 ± 0	24% ± 1%
ICA 27	41,5 ± 0,1	23 ± 0	33% ± 1%
ICA 28	23 ± 3,4	0 ± 0	28% ± 3%
ICA 29	33 ± 2,4	61,5 ± 1,7	23% ± 1%
ICA 30	20,5 ± 1,2	0 ± 0	30% ± 0%
ICA 31	24 ± 6,1	6,5 ± 4,0	39% ± 5%
ICA 32	9,5 ± 4,0	63 ± 0	51% ± 1%
ICA 33	15,5 ± 4,1	0 ± 0	48% ± 2%
ICA 34	0 ± 0	0 ± 0	47% ± 0%
ICA 35	16 ± 0	33 ± 0	39% ± 3%
ICA 36	0 ± 0	63 ± 3,4	50% ± 0%
ICA 37	12,25 ± 1,5	19,5 ± 4,0	45% ± 4%
ICA 38	31,5 ± 3	16 ± 0	29% ± 1%
ICA 39	21 ± 5,7	6,5 ± 7,5	23% ± 0%
ICA 40	0 ± 0	6 ± 0	43% ± 1%
ICA 41	0 ± 0	66 ± 0	42% ± 0%
ICA 43	22,25 ± 1,5	44,5 ± 5,9	35% ± 2%
ICA 44	37 ± 2	8,25 ± 5,6	31% ± 1%
ICA 45	43 ± 8,0	56 ± 0	24% ± 1%
ICA 46	38 ± 5,7	43 ± 8,0	32% ± 2%
ICA 47	0 ± 0	0 ± 0	43% ± 0%
ICA 48	6,5 ± 4,0	0 ± 0	33% ± 5%
ICA 49	23,65 ± 4,7	8 ± 0,9	27% ± 4%
ICA 50	0 ± 0	0 ± 0	23% ± 0%
ICA 51	28 ± 2,3	31,5 ± 1,7	28% ± 1%
ICA 52	26,5 ± 7,5	23 ± 0	22% ± 4%
ICA 53	10 ± 0	40,5 ± 1,8	52% ± 0%
ICA 54	0 ± 0	0 ± 0	43% ± 3%
ICA 55	0 ± 0	31 ± 1,73	38% ± 3%
ICA 56	36 ± 0	63 ± 0	52% ± 0%
ICA 58	0 ± 0	0 ± 0	55% ± 0%
ICA 59	0 ± 0	5,75 ± 6,7	45% ± 5%
ICA 60	10 ± 1,1	0 ± 0	27% ± 0%
ICA 61	8 ± 0,9	25,5 ± 5	21% ± 3%
ICA 62	0 ± 0	0 ± 0	53% ± 0%
ICA 63	24,5 ± 0,9	0 ± 0	41% ± 6%
ICA 64	26,5 ± 4,04	0 ± 0	30% ± 5%

Isolados	Média do E24 com as células	Média do E24 com os Sobrenadantes	Valor de redução da tensão %
ICA 65	10 ± 0	0 ± 0	33% ± 3%
ICA 66	6,5 ± 7,8	0 ± 0	27% ± 0%
ICA 67	0 ± 0	0 ± 0	43% ± 1%
ICA 68	35 ± 5,7	38 ± 2,5	48% ± 0%
ICA 69	2,5 ± 5	0 ± 0	29% ± 5%
ICA 70	28 ± 0,9	0 ± 0	48% ± 2%
ICA 71	32,25 ± 1,5	0 ± 0	49% ± 1%
ICA 72	25,75 ± 5,0	0 ± 0	36% ± 2%
ICA 73	0 ± 0	0 ± 0	51% ± 1%
ICA 74	0 ± 0	8 ± 0,9	40% ± 5%
ICA 75	16 ± 0	60 ± 0	43% ± 0%
ICA 76	13 ± 2,4	60 ± 0	42% ± 0%
ICA 77	33,75 ± 1,5	0 ± 0	42% ± 0%
ICA 78	26 ± 0	27,5 ± 5	38% ± 3%
ICA 79	0 ± 0	23 ± 0	23% ± 3%
ICA 80	27 ± 2	63 ± 0	43% ± 1%
ICA 81	6 ± 0	61,5 ± 1,73	44% ± 1%
ICA 82	20 ± 0	5 ± 5,7	42% ± 0%
ICA 83	3 ± 0	0 ± 0	23% 5 %±
ICA 84	0 ± 0	55 ± 5,7	52% ± 0%
ICA 85	3 ± 0	0 ± 0	50% ± 2%
ICA 86	50 ± 0	36 ± 0	33% ± 0%
ICA 87	2,5 ± 5	32,25 ± 2,8	40% ± 2%
ICA 88	60 ± 0	63,75 ± 1,5	43% ± 1%
ICA 89	0 ± 0	8 ± 2,3	36% ± 1%
ICA 90	1,5 ± 1,7	0 ± 0	38% ± 1%
ICA 91	16,5 ± 1,9	0 ± 0	32% ± 4%
ICA 92	0 ± 0	36 ± 0	54% ± 1%
ICA 93	33 ± 2,4	60,75 ± 1,5	48% ± 4%
ICA 94	16 ± 0	0 ± 0	41% ± 1%
ICA 95	30 ± 0	31,25 ± 3,5	35% ± 2%
ICA 96	30 ± 3,4	0 ± 0	32% ± 2%
ICA 98	5 ± 5,7	0 ± 0	30% ± 0%
ICA 99	10 ± 0	0 ± 0	43% ± 1%
ICA 100	0 ± 0	10 ± 1,1	41% ± 1%
ICA 101	16 ± 0	0 ± 0	38% ± 1%
ICA 102	48 ± 1,7	0 ± 0	42% ± 0%
ICA 103	20 ± 1,1	30 ± 3,4	29% ± 3%

APÊNDICE C - Resultado geral das linhagens positivas para os genes estudados.

Bactéria	PCR - <i>sfp</i>	PCR - <i>ItuD</i>	PCR - <i>lpa14</i>
ICA 9	+	-	-
ICA 10	-	+	+
ICA 12	-	+	+
ICA 13	-	+	+
ICA 24	+	-	-
ICA 32	+	-	-
ICA 36	-	+	+
ICA 41	-	+	+
ICA 44	+	-	-
ICA 56	+	-	-
ICA 60	+	-	-
ICA 62	-	+	-
ICA 74	+	+	-
ICA 75	+	-	-
ICA 81	+	-	-
ICA 82	+	-	-
ICA 85	-	-	+
ICA 86	+	-	-
TIM 3	-	+	+
TIM 10	+	-	-
TIM 13	-	+	-
TIM17	+	-	-
TIM 26	-	+	+
TIM 27	+	-	-
TIM 58	+	+	-
TIM 60	-	-	+
TIM 61	+	-	-
TIM 63	+	-	-
TIM 67	-	+	+
TIM 68	+	-	-
TIM 87	-	+	+
TIM 90	-	+	-
TIM 94	-	+	-
TIM 96	-	+	+
TIM 100	-	-	+
TIM 103	-	+	-
TIM 104	-	+	-