



**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**PROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS E GENES ENVOLVIDOS COM A  
PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES EM SOLO DE MANGUEZAL**

**RAPHAELA VASCONCELOS GOMES BARRETO**

**Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo**

**(Orientadora)**

**LINHA DE PESQUISA: Biotecnologia Industrial**

**PROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS E GENES ENVOLVIDOS COM A  
PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES EM SOLO DE MANGUEZAL**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Aprovada em 13/07/2011

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo – Orientadora  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Profa. Dra. Fátima Menezes Bento - Examinadora  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

---

Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves - Examinadora  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos - Examinador  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Profa. Dra. Steli Rodrigues - Examinadora  
Universidade Federal do Ceará - UFC

**RAPHAELA VASCONCELOS GOMES BARRETO**

**PROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS E GENES  
ENVOLVIDOS COM A PRODUÇÃO DE  
BIOSURFACTANTES EM SOLO DE MANGUEZAL**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo

**FORTALEZA**

**2011**

B264p Barreto, Raphaela Vasconcelos Gomes  
Prospecção de micro-organismos e genes envolvidos com a produção de biossurfactantes em solo de manguezal / Raphaela Vasconcelos Gomes Barreto. – 2011.  
148 f. : il. color., enc.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo  
Área de concentração: Biotecnologia Industrial  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Rede Nordeste de Biotecnologia, Fortaleza, 2011.

1. Bioquímica 2. Biosurfactants 3. Emulsificantes 4. Tensoativos 5. Solos – Remediação I. Melo, Vânia Maria Maciel (Orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título

CDD 660.6

*“A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele,  
mas aquilo em que ele nos transforma.”*

*John Ruskin*

A meus pais, *Aurilêda e Chagas*  
aos meus irmãos, *Júnior e Genésio*,  
ao meu esposo, *Marcelo*  
e ao meu mais recente tesouro, *Sarah*,  
dedico com carinho.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu **Deus**, incomparável e maravilhoso, por cuidar de mim de modo tão pessoal, por me abençoar com tantas conquistas ao longo da minha caminhada e me encantar a cada passo dado no estudo da Sua perfeita Criação. Em especial, obrigada pelo maior presente que já recebi, minha filha Sarah, tão linda e abençoada... Mais uma vez, o Senhor me surpreendeu! Muito obrigada!

Aos meus pais, **Chagas** e **Aurilêda**, por todo o investimento que fizeram em mim, por estimularem a realização dos meus sonhos, por acreditarem em mim independente das circunstâncias e por permitirem que eu aprendesse com meus erros. Obrigada por tanto estarem presente nesses meses finais, quando Sarah nasceu e eu precisei de uma ajuda sobre-humana para dar conta de todas as minhas atribuições e pendências. Obrigada por sempre me proporcionarem o melhor que vocês puderam em tudo o que me deram. Vocês são um exemplo valioso para mim de amor e educação de filhos.

Aos meus irmãos, **Júnior** e **Genésio**, pelos inúmeros momentos de descontração e por sempre torcerem por mim quando nas minhas investidas acadêmicas de me aperfeiçoar na minha área. Obrigada por, mesmo sem entenderem nada do que eu estava falando, ficarem me ouvindo comentar, toda empolgada, sobre bactérias produtoras de biossurfactantes e acreditarem que um dia eu vou ganhar rios de dinheiro com isso (não seria nada mal...). Vocês são mesmo maravilhosos! Agradeço a Deus por ter me dado dois irmãos. Acho que seria muito difícil conviver com uma irmã numa hora dessas!

Ao meu amado esposo, **Marcelo**, por sua amizade, cumplicidade, pelo seu amor e todo o cuidado e paciência comigo. Muito obrigada por sempre se esforçar para que eu pudesse estudar da melhor forma possível e por entender os inúmeros momentos de ausência que precisamos enfrentar para que eu pudesse chegar onde estou hoje. Obrigada por sempre acreditar que eu posso ir mais além e por tentar me convencer disso quando me encontrei cansada e desestimulada. Obrigada pelos diversos investimentos ilimitados na minha vida, os quais me proporcionaram condições cada vez melhores para que eu pudesse me aperfeiçoar na minha carreira. Obrigada por ser

um pai tão empenhado e dedicado e por me ajudar, especialmente, durante as madrugadas em claro!

A minha filha, **Sarah**, pelo seu tão doce e puro sorriso, que me renovou durante as madrugadas, nas quais muitas vezes estive esgotada por ter que trabalhar na tese e amamentar. Minha filha, obrigada pelo seu olhar, que sempre renovou as minhas esperanças e me deu forças para seguir em frente. Obrigada por tornar minha vida infinitamente melhor (como pude viver sem você antes?!) e por me fazer sentir mais humana e mais perto de Deus, cada vez que supri as suas necessidades, que lhe toquei com carinho e lhe acalantei em meus braços. Obrigada pelo privilégio de poder ser sua mãe. Amo você incondicionalmente! Espero que um dia você possa ler estas palavras...

A minha sogra, **Elda Gomes Barreto** e minha cunhada, **Sandra Barreto Dantas**, por terem inúmeras vezes comparecido a minha casa para cuidarem da Sarinha enquanto eu precisei terminar a redação deste trabalho. Obrigada por terem cuidado de mim também, pelos momentos de alegria, e por levarem lanches reforçados para que eu pudesse cumprir bem o papel de recém mãe e quase doutora!

A **Rosilene Paulo Batista**, uma das pessoas mais indispensáveis na conclusão deste trabalho e, mais ainda, nesse momento da minha vida! Pela ajuda valiosa nas atividades domésticas, de modo a manter impecavelmente organizado e limpo tudo em minha volta. Obrigada por cuidar de mim e da Sarah de uma forma tão especial, com tanto carinho e por me agradar com seus quitutes inigualáveis! Obrigada pela sua companhia! Obrigada mesmo! Você foi mais um presente de Deus em minha vida!

A minha querida orientadora, **Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo**, que antes de tudo, foi sempre uma “mãe” e amiga pra mim, desde que me recebeu, há pouco mais de 11 anos (!!!) em seu laboratório e me ensinou tudo o que sei hoje. Obrigada professora, pelo exemplo de profissionalismo, pela perseverança em lutar por seus sonhos, que sempre me contagiou a persistir em busca do que desejou o meu coração. Obrigada pelas conversas acadêmicas e pelos conselhos maternais, pelos inúmeros momentos de alegria, por sua paciência e exortações, pela sinceridade, algumas vezes dolorosa, mas necessária para meu amadurecimento profissional e pessoal. Obrigada por me apoiar e estimular minha carreira acadêmica. Obrigada por confiar em mim e

permitir que eu abraçasse outras atividades no laboratório, muito além daquelas da bancada. Isto foi muito importante para que eu entendesse todas as burocracias que um professor-pesquisador precisa enfrentar para seguir em frente no país em que vivemos! Realmente fui privilegiada todos esses anos pela nossa convivência e por tudo o que pude aprender ao seu lado. Uma escola e tanto! Coisas que, como se diz, “não tem preço”! Nunca me esquecerei disso!!! Espero que Deus me permita ser uma multiplicadora de todo esse conhecimento.

A **Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves** pela amizade, pela disposição em me ajudar sempre que precisei e por ter disponibilizado o seu laboratório para a realização das medidas de tensão superficial. Obrigada pela hospitalidade dos seus bolsistas que sempre se empenharam para que eu me sentisse à vontade para utilizar o seu laboratório, em especial **Darlane Freitas** e **Marylane de Sousa**. E mais ainda, por ter aceitado o convite para participar da qualificação e defesa, sempre acrescentando informações preciosas ao trabalho.

Ao **Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos**, pela parceria, amizade e por sua ajuda sempre disponível. Obrigada por ter aceitado o convite para contribuir com o crescimento deste trabalho, ao participar das bancas de qualificação e defesa.

A **Profa. Dra. Sueli Rodrigues** pela disponibilidade em aceitar a participação na banca e pelas contribuições para o melhoramento do trabalho.

A **Profa. Dra. Fátima Menezes Bento**, pela receptividade ao convite, por ter prontamente aceitado estar conosco para participar da banca da defesa e por agregar informações importantes nesta pesquisa. Que esta banca possa marcar o início de uma parceria entre pesquisadores do Nordeste e do Sul na área de biorremediação de solos!

Ao **Prof. Dr. André Bezerra dos Santos**, por ter aceitado o convite em participar da banca examinadora na qualificação e pelo início da parceria tão promissora entre o Laboratório de Saneamento (LABOSAN) e o Laboratório Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBiotech).

Aos **professores da Rede Nordeste de Biotecnologia**, responsáveis direta ou indiretamente pela minha formação enquanto estudante, profissional e cidadã. Obrigada pela oportunidade de tê-los conhecido e pelo conhecimento compartilhado.

Aos companheiros do LEMBitech: **Tallita Tavares, Geórgia Colares, Vanessa Câmara, Bárbara Cibelle, Natália Falcão, Kizeane Fajardo, Denisse Hissa, Hortência Barroso, Andréa Oliveira, Walderly Melgaço, Tatiana Bomfim, Tecia Carvalho, Samantha Costa, Alysson Lira**, por nossa amizade, respeito e apoio ao longos desses anos. **Júlio Ximenes**, muito obrigada também pelas análises de concentração micelar crítica! Em especial e com muito carinho, a **Vanessa Nogueira, Lidianne Rocha, Laís Feitosa e Elisângela Alencar**, minhas grandes amigas tanto das horas mais sérias, quanto dos momentos de falar bobagens. Obrigada por, mesmo não aceitando, tolerarem minhas inúmeras reservas consecutivas do “shaker” durante toda a semana! Obrigada amigas por sempre se disponibilizarem a me ajudar no que eu precisasse, mesmo que fosse só de um ombro pra eu chorar quando estava muito cansada.

A minha primeira (co-)orientada **Luína Benevides Lima**, pelo seu entusiasmo e alegria e por suas palavras no meio do caos: “Relaxa... vai dar tudo certo!”. Obrigada pela sua perseverança e por ter se deixado orientar por mim, principalmente nos momentos em que precisei ser mais firme com você. Nós duas ganhamos com isso, tenha certeza! Foi muito bom ver seu crescimento ao longo desses anos do meu doutorado. Obrigada pela amizade e pela prestatividade. Espero ter muitos alunos assim, como você, inteligentes, entusiasmados e que contagiem o ambiente de forma positiva.

A **Danielle Alves**, pela amizade construída em tão pouco tempo, mas que me trouxe muitos momentos agradáveis. Obrigada pela sua sempre disponibilidade em me ajudar em tudo o que precisei, em especial por me explicar, de forma tão didática, o que significa metodologia de superfície de resposta e qual a sua importância para um trabalho como o meu. Obrigada pela torcida para que eu conseguisse alcançar meus objetivos e pelos vários momentos de descontração, nos quais você me fez dar boas risadas.

A **Fernanda Paes**, minha grande amiga que, mesmo distante, sempre apoiou o meu trabalho e acreditou no meu sucesso. Obrigada pelas conversas não acadêmicas também, que me distraíram quando estive bem cansada. Obrigada amiga! Não posso deixar de agradecer sua ajuda nas análises estatísticas. Acredito que ainda faremos muitos trabalhos juntas!

Aos funcionários da UFC **Rivaldina do Carmo e Valdenor de Oliveira**, sempre disponíveis em ajudar a todos. Obrigada por manterem impecável o ambiente de trabalho, inclusive nos necessários sábados de manhã! Obrigada pelo bom humor de vocês e por trabalharem com tanto prazer, motivando a todos em sua volta.

Aos amigos conquistados ao longo do doutorado, em especial, **Célio Melo, Rosa Araújo, Anabelle Camarotti e Teresa Cristina** pelos momentos de alegria, descontração, por dividirem comigo as tensões antes das provas e por serem pessoas tão agradáveis que são verdadeiros exemplos de vida para mim. Fui premiada ao conhecê-los!

A minha amiga **Emanuelle Rabelo**, que cuidou de mim durante toda a minha gravidez, quando estivemos morando juntas em Mossoró-RN, depois que passei no concurso da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Obrigada por sempre se empenhar para me ver bem, confortável e por me estimular a prosseguir, reforçando que um dia, em breve, eu defenderia a minha tese e curtiria essa nova fase da minha vida com mais calma e dedicação.

Aos **meus alunos** dos cursos de Biotecnologia e Ecologia da UFERSA, turmas de 2010.2 que me permitiram prazerosos momentos de aprendizagem mútua. Obrigada também por sempre torcerem para que a Sarah chegasse bem e saudável.

Aos meus amigos de toda a vida **Paulo e Diana Medina, Gabriela Almeida e Fabiano Soares, Davi Gonçalves e Julianne Andrade, Fernanda e Francisco Vieira, Ricardo Macedo e Aila Kayatt, Elysangêla e Gean Alves, Ruth e Cristian Gomes**. Obrigada pelos momentos de alegria, distração, pelas exortações, orações e pelas palavras de sabedoria. Por acreditarem em mim e me ajudarem a prosseguir. Obrigada por estarem sempre por perto, mesmo algumas vezes geograficamente distantes, por

serem bons exemplos em minha vida. E pela disponibilidade em nos ajudar no que fosse necessário, inclusive em cuidar da Sarinha, independente das circunstâncias.

Ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa concedida e a **FINEP-CTPETRO** pela ajuda financeira

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, ou que porventura tenha deixado de citar especificamente neste momento. Sintam-se gratos de coração por terem me ajudado de alguma forma!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	xiii
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xvi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	xvii
<b>RESUMO</b>	xix
<b>ABSTRACT</b>	xx
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	22
<b>2. OBJETIVOS</b>	26
2.1. Objetivo geral	26
2.2. Objetivos específicos	26
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	28
3.1. Importância ecológica dos Manguezais	28
3.2. O grupo <i>Bacillus</i>	31
3.3. Sistema de biomoléculas produzidas por espécies <i>Bacillus</i>	32
3.3.1. Biossurfactantes e bioemulsificantes	36
3.3.1.1. Propriedades funcionais dos biossurfactantes e bioemulsificantes	39
3.3.1.2. Métodos de estudos para detecção de biossurfactantes	43
3.4. Utilização de micro-organismos e seus produtos em biorremediação	46
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	54
4.1 Materiais	54
4.2. Metodologia	54
4.2.1. Coleta do solo	54
4.2.2. Análise dos parâmetros ambientais e caracterização das amostras de solos	56
4.2.3. Isolamento de linhagens produtoras de esporos	56
4.2.4. Seleção de bactérias produtoras de biossurfactantes	57
4.2.4.1. Análise da atividade emulsificante (E24)	57
4.2.4.2. Medida da Tensão Superficial	58
4.2.4.3. Análise estatística dos dados	58
4.2.5. Seleção de bactérias produtoras de biossurfactantes por métodos moleculares	58
4.2.5.1. Pesquisa do gene <i>sfp</i>	58
4.2.5.2. Pesquisa dos genes <i>ituD</i> e <i>lpa14</i>	59
4.2.6. Ensaio de atividade antifúngica	59
4.2.7. Teste da dispersão do óleo com linhagens promissoras	60

4.2.8. Ensaio de simulação em biorremediação	61
4.2.8.1. Limpeza de solo contaminado com petróleo	61
4.2.8.2. Remoção de óleo na superfície de água do mar	61
4.2.9. Extração e análise dos biossurfactantes parcialmente purificados	62
4.2.10. Estudo da formação de micelas por condutividade	63
4.2.11. Identificação molecular e análise filogenética das linhagens promissoras	63
<b>5. RESULTADOS</b>	66
5.1. Caracterização físico-química dos solos	66
5.2. Isolamento de linhagens produtoras de esporos do solo do manguezal	67
5.3. Seleção de linhagens produtoras de biossurfactantes	68
5.4. Pesquisa dos genes <i>sfp</i> , <i>ituD</i> e <i>lpa14</i>	71
5.5. Ensaio de dispersão do óleo	74
5.6. Construção da curva de crescimento e ensaios de caracterização do biossurfactante	76
5.6.1. Estudo da formação de micelas por condutividade	80
5.7. Testes de simulação em biorremediação com amostras reais	80
5.7.1. Limpeza de solo contaminado com petróleo	80
5.7.2. Remoção de petróleo da água do mar	82
5.8. Purificação parcial do biossurfactante	83
5.9. Identificação molecular das linhagens selecionadas	86
<b>6. DISCUSSÃO</b>	91
<b>7. CONCLUSÕES</b>	112
<b>8. PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	115
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	117
<b>10. ANEXOS</b>	139
ANEXO A	139
ANEXO B	142
ANEXO C	145

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Distribuição dos manguezais no mundo. Destaque em vermelho. 26
- Figura 2 -** Organização das moléculas na (A) tensão superficial e (B) interfacial. 40
- Figura 3 -** Ilustração dos processos de (A) emulsificação (B) de-emulsificação. 40
- Figura 4 -** (A) Relação das variações de tensão superficial e interfacial com a concentração de surfactante no sistema. (B) Formas de organização das moléculas de biossurfactante acima da concentração micelar crítica. 42
- Figura 5 -** (A) Mapa dos estuários do Ceará, destacando em vermelho a localização do estuário do Rio Jaguaribe. (B) Imagem de satélite do estuário, mostrando os pontos de coleta no manguezal. 55
- Figura 6 -** Aspecto das amostras de solo coletados (A) à beira do Rio Jaguaribe (P1), (B) na rizosfera de *R. mangle* (P2) e (C) na rizosfera de *A. schaueriana* (P3) e seus respectivos isolados obtidos após o choque térmico. 67
- Figura 7 -** Características morfológicas de isolados do Rio Jaguaribe, cujos aspectos referem-se ao grupo *Bacillus*. (A) Jag1732; (B) Jag248; (C) Jag310. Seta indicando célula com esporo. Lâminas coradas pelo método de Gram e fotografadas em microscópio óptico com aumento de 1000 x. 68
- Figura 8 -** Análise de agrupamento dos valores obtidos nos ensaios de (A) tensão superficial e (B) índice de emulsificação. Quadrados vermelhos em ambos os gráficos indicam os melhores resultados. 69
- Figura 9 -** Medida da tensão superficial final após o crescimento das culturas em Meio Mineral por 48 h. Seta indicando valor da tensão superficial inicial, antes do crescimento microbiano. 70
- Figura 10 -** Medida do índice de emulsificação do querosene com sobrenadante das culturas, após o crescimento em Meio Mineral por 48 h. Seta indicando o valor de emulsificação do meio esterilizado. 70
- Figura 11 -** (A) Atividade emulsificante formada com o sobrenadante da cultura Jag248. (B) Controle do ensaio, formado pela mistura de Meio Mineral, querosene e Tween 80, evidenciando a camada emulsificada. (C) Emulsão após 30 dias: tubo à esquerda, controle sem adição do sobrenadante e, tudo à direita, acrescido do sobrenadante. 71
- Figura 12 -** (A) Pesquisa do gene *sfp*. M - marcador; (1) Jag15B; (2) Jag185, (3) Jag249 e (4) *B.subtilis* LAMI008. (B) Pesquisa dos genes *ituD* e *lpa14*. M - marcador; (1) *B. subtilis* LAMI009 para o gene *lpa14*; (2) Jag248 para o gene *ituD*; (3) Jag248 para o gene *lpa14*; (4) Jag255 para *ituD* e *lpa14*. Tamanho dos fragmentos: *lpa14* - 675 pb; *ituD* - 1203 pb. 72
- Figura 13 -** Atividade da linhagem Jag248 contra os fungos (A) *Fusarium oxysporum*; (B) *Mucor* sp.; (C) *Pythium oligandrum*; (D) *Penicillium herguei* e (E) *Aspergillus niger*. 73

- Figura 14 -** (A) Inibição de *Mucor* sp. por Jag248. (B) Detalhe evidenciando (1) a presença exclusiva de hifas vegetativas na porção mais próxima ao crescimento bacteriano e (2) hifas reprodutivas (aéreas) apenas na porção mais distante. Lâminas coradas com azul algodão de lacto-fenol e fotografadas em microscópio óptico com aumento de 400 x. 74
- Figura 15 -** Relação entre o tamanho dos halos de dispersão de óleo e o volume de sobrenadante adicionado ao sistema óleo-água. 74
- Figura 16 -** Comportamento de dispersão do óleo após adição dos sobrenadantes brutos das bactérias isoladas do manguezal (A) Jag185; (B) Jag245; (C) Jag248; (D) Jag249; (E) Jag255 e (F) Jag1732. 75
- Figura 17 -** Diâmetro (cm) das zonas limpas formadas na superfície do filme de petróleo, com o sobrenadante da cultura dos seis isolados selecionados. 76
- Figura 18 -** (A) Curva de crescimento de Jag248 em Meio Mineral, incubada por 48 h a 30°C sob agitação de 150 rpm. Em destaque, os pontos 7h, 11h e 40h, mostrando a dinâmica da produção do biossurfactante e do desemulsificante. Valores acima das figuras indicam as medidas de emulsificação (E24 - %) e de tamanho de halo de dispersão de óleo (em cm). Todos com os respectivos desvios. (B) Aspecto da cultura com 7 h de crescimento, mostrando espuma abundante. (C) Subcultivo de Jag248 em Agar Nutritivo contendo petróleo na superfície, em diferentes tempos de incubação. Halos de afastamento do óleo ao redor das colônias sugerem a produção de tensoativos pela cultura. 78
- Figura 19 -** Aspecto do espalhamento do óleo em diferentes valores de pH. (A) pH 2.0; (B) pH 4.0; (C) pH 5.0; (D) pH 7.0; (E) pH 8.0; (F) pH 9.0; (G) pH 10.0. (H) Comparação entre os tamanhos dos halos de espalhamento de óleo (cm) de acordo com as mudanças de pH. 79
- Figura 20 -** Relação entre condutividade e diluições na formação de micelas (A) do biossurfactante de *Bacillus* sp. Jag248 e (B) do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS). 80
- Figura 21 -** (A) Aspecto do solo no manguezal da Baía de Todos os Santos, mostrando o petróleo impregnado ao longo dos anos. (B) Amostra utilizada nos ensaios de limpeza de solo. (C) Preparo das amostras. Lado esquerdo – solo com água marinha (controle negativo); lado direito – solo imerso no sobrenadante de Jag248. (D) Detalhe do solo desligado do petróleo imediatamente após a imersão no sobrenadante da cultura. (E) Solo recuperado após 12 h de agitação. Amostra esquerda, controle e amostra direita, experimental, mostrando o solo acumulado no fundo da vidraria. (F) Aspecto dos solos recuperados, após a secagem. Placa esquerda, controle e direita, experimental. 81
- Figura 22 -** (A) Aspecto do petróleo após agitação com sobrenadante de Jag248. (B) Controle, agitado com água marinha. 82
- Figura 23 -** Comportamento de ruptura da mancha de petróleo na superfície da água do mar após adição do sobrenadante não purificado de Jag248. (A) Sobrenadante borrifado sobre a mancha. (B) Sobrenadante gotejado no centro da mancha. (C) Sobrenadante adicionado nas extremidades da mancha. 83

- Figura 24** - Ensaio de espalhamento do óleo. (A) Sobrenadante da cultura Jag248; (B) SDS a 10%; (C) Tween 80; (D) QUAT puro; (E) Água destilada (controle negativo). 83
- Figura 25** - (A) Cromatograma do sobrenadante parcialmente purificado não aquecido (azul), aquecido (preto) de Jag248 e da surfactina comercial a 0,5mg/mL (verde). (B) Destaque para o perfil cromatográfico dos produtos de Jag248. Setas vermelhas indicam os picos detectados. (C) Cromatograma dos lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis* RB14, onde IT= Iiturina, PL= Plipastatina e SF = Surfactina, destacando o perfil para iturina. Em vermelho, destaque para os picos com tempos de eluição semelhantes. 84
- Figura 26** - Ensaio de espalhamento de óleo após purificação do sobrenadante de Jag248. (A) Purificado de Jag248 não aquecido; (B) Purificado de Jag248 aquecido e (C) Surfactina comercial a 0,5 mg/mL. 85
- Figura 27** - Placa A. (1) Inibição de *Aspergillus niger* por Jag248; (2) Controle negativo (água); (3) e (4) sobrenadante filtrado e não tratado, (5) células lisadas de Jag248. Placa B. (6) Controle negativo - extração com diclorometano; (7) Fração extraída com diclorometano; (8) Fração extraída com acetato de etila; (9) Controle negativo - extração com acetato de etila; (10) Fração aquosa; (11) Fração extraída com n-butanol. 86
- Figura 28** - Caracterização cultural das linhagens selecionadas dentre os isolados do solo do manguezal. Cultivo em meio ATGE a 30 °C por 24 h (Aumento de 6,4x). Escala de 1,0 mm. (A) Jag185; (B) Jag245; (C) Jag248; (D) Jag249; (E) Jag255; (F) Jag1732. 87
- Figura 29** - Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbour-Joining* demonstrando as relações evolutivas entre as linhagens de bactérias estudadas e linhagens de micro-organismos relacionados com base na sequência do gene ribossomal 16S. 89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> -	Características gerais das famílias de lipopeptídeos de <i>Bacillus</i> .	35
<b>Tabela 2</b> -	Comparação entre as principais técnicas de detecção de microorganismos produtores de biossurfactantes.	46
<b>Tabela 3</b> -	Aplicações da recuperação melhorada do petróleo por ação microbiana (MEOR).	50
<b>Tabela 4</b> -	Condições operacionais do sistema HPLC.	62
<b>Tabela 5</b> -	Análise dos parâmetros físico-químicos dos solos do manguezal do Rio Jaguaribe.	66
<b>Tabela 6</b> -	Análise das sequências obtidas do gene do rRNA 16S de cada isolado, utilizando a ferramenta BLASTn do <i>GenBank</i> .	87

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{L}$	microlitro
ANAS	Agar Nutritivo com Agar Sabouraud
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATGE	Agar, Triptona, Glucose e Extrato de levedura
BLASTn	<i>Basic Local Alignment Search Tool for nucleotide</i>
CE	Ceará
CMC	Concentração Micelar Crítica
CTAB	<i>Cetyltrimethylammonium bromide</i> (Brometo de Cetil Trimetil Amônio)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfatado
E24	Atividade emulsificante após 24h
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)
g	Gramas
<i>g</i>	Força centrífuga relativa
GPS	<i>Global Positioning System</i> (Sistema de posicionamento global)
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	High-performance liquid chromatography (or high-pressure liquid chromatography)
itu	iturina
Jag	Jaguaribe
LEMBiotech	Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia
<i>lpa14</i>	<i>lipopeptide antibiotic production</i> da cepa <i>B.subtilis</i> RB14
MEOR	<i>Microbial enhanced oil recovery</i> (Recuperação melhorada do petróleo por micro-organismos)
Mf	Massa final
Mi	Massa inicial
mL	Mililitro
mM	millimolar
mN/m	Mili-Newton por metro
MO	Matéria orgânica
nm	Nanômetro
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
pH	Potencial Hidrogeniônico

PPI	Peso por ignição
PVC	Cloreto de polivinila
QUAT	Quaternário de Amônio
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
SAC	Surface active compounds
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-HCl + EDTA
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TS	Tensão superficial
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro
UV	Ultravioleta

## RESUMO

Biossurfactantes e bioemulsificantes são moléculas de caráter anfifílico que se destacam respectivamente por suas propriedades tensoativas e estabilizadoras de emulsões, além de alguns apresentarem atividade antimicrobiana. Pesquisas que envolvem a busca por micro-organismos produtores dessas moléculas têm crescido em todo o mundo, devido à eficiência dos biossurfactantes microbianos frente aos surfactantes químicos e sua possível aplicação na biorremediação de solo e água contaminados por petróleo e derivados. O presente trabalho teve como objetivo principal selecionar bactérias promissoras na produção de biossurfactantes ou bioemulsificantes dentre 100 linhagens isoladas de amostras de solos de manguezal. A recuperação das bactérias foi realizada através do tratamento térmico do solo a 80 °C por 1h seguido de sub-cultivo dos micro-organismos em ATGE (agar, triptona, glucose e extrato de levedura), incubado a 30 °C por 24 h. Esta metodologia favoreceu a seleção de bactérias produtoras de esporos, onde se enquadram as espécies do gênero *Bacillus*, conhecidas por produzir biossurfactantes. A seleção das linhagens produtoras das moléculas de interesse foi realizada através do cultivo dos micro-organismos em Meio Mineral a 30 °C por 48 h, seguido da análise do sobrenadante da cultura por medida da tensão superficial e do índice de emulsificação (E24), ensaios que avaliam, respectivamente, a produção de biossurfactantes e de bioemulsificantes. Em paralelo, foi realizada a pesquisa do gene da surfactina, o biossurfactante mais eficiente dentre os produzidos por *Bacillus* e da iturina, um tensoativo conhecido por suas propriedades antifúngicas. Os resultados dos experimentos de cultivo foram analisados pelo método estatístico de agrupamento para seleção de isolados promissores. Cinco isolados foram detectados como bons produtores de biossurfactantes (Jag248, Jag252, Jag263, Jag263.1 e Jag1732) e seis para síntese de emulsificantes (Jag185, Jag191, Jag198, Jag212, Jag242, e Jag310). Os isolados Jag245, Jag249, Jag251 e Jag255 produziram moléculas com as duas propriedades. O sobrenadante de Jag248 apresentou resultados que sugeriram a produção de um desemulsificante. O gene *sfp*, ligado à produção de surfactina, foi detectado apenas nas linhagens Jag15B, Jag185 e Jag249. Dentre os isolados anteriormente descritos, seis (Jag185, Jag245, Jag248, Jag249, Jag255 e Jag1732) foram selecionadas para o ensaio de dispersão do óleo, que avaliou a eficiência dos biossurfactantes na remoção de óleo em água marinha. Jag248, Jag249 e Jag255 foram os que apresentaram os melhores resultados, com halos superiores a 50% do diâmetro da placa. Dentre estes últimos, Jag248 foi escolhida para ensaios de limpeza de solo e água marinha contaminados com petróleo. Jag248 foi identificado como pertencente ao gênero *Bacillus* e mostrou grande eficácia na limpeza de solo impregnado por petróleo, bem como na remoção de óleo em água marinha, sendo melhor ainda que os surfactantes químicos utilizados para fins comparativos. *Bacillus* Jag248 teve seu produto preliminarmente identificado como iturina, pela amplificação dos genes *ituD* e *lpa14* por PCR. Esse isolado mostrou ainda excelente atividade antifúngica. O tensoativo foi apenas parcialmente purificado por HPLC, e apresentou formação de micelas intra e intermoleculares, em duas diluições distintas, significativamente mais baixas que a do surfactante comercial SDS. Os resultados merecem destaque visto não haver relatos na literatura de iturinas com atividade tensoativa tão relevante. Nesse contexto, o presente estudo vem reforçar que os manguezais abrigam inúmeras espécies microbianas ainda desconhecidas, certamente detentoras de uma rica diversidade genética e potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Biossurfactantes, bioemulsificantes, biorremediação, manguezais, solo.

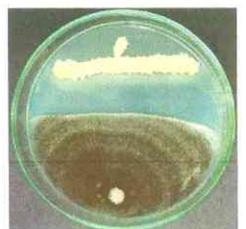
## ABSTRACT

Biosurfactants and bioemulsifiers are amphiphilic compounds which have antimicrobial properties and the ability of reducing surface tension, and stabilizing emulsions. These molecules have attracted major attention worldwide due to their great efficiency over chemical surfactants in the bioremediation of environments contaminated by oil and derivatives. The main objective of this study was to select bacteria able to produce biosurfactants among 100 strains isolated from soil samples collected in a northeast Brazil mangrove. For bacteria isolation, soils were submitted to thermal treatment at 80 °C for 1h, aiming to select only spore producing species. After that, the soils were cultivated in ATGE medium at 30 °C for 24h for spore germination and growth. This methodology intended to capture species of the genus *Bacillus*, which are known biosurfactant producers. Among the obtained isolates the selection of biosurfactant producing strains was carried out through cultivation in Mineral broth at 30 °C for 48h, followed by supernatant analyses for superficial tension reduction and emulsification, to evaluate, respectively, production of biosurfactants and bioemulsifiers, and also antifungal activity. Simultaneously, the isolates were screened for genes related with those activities by PCR using primers for surfactin and iturin. The results were submitted to cluster analysis in order to elect the most efficient strains. Five strains were selected as good biosurfactant producers: Jag248; Jag252; Jag263; Jag263.1 and Jag1732; while six strains were considered good bioemulsifiers: Jag185; Jag191; Jag198; Jag21; Jag242; and Jag310. The strains Jag245, Jag249, Jag251 and Jag255 showed both properties. Interestingly, the supernatant of Jag248 presented demulsifying activity. The *sfp* gene, related to surfactin production, was detected only in Jag15B, Jag185 and Jag249. The isolates, Jag185, Jag245, Jag248, Jag249, Jag255 and Jag1732 were tested for oil dispersion, and Jag248, Jag249 and Jag255 have showed the best results, with halos greater than 50% of the plate diameter. Among these strains, Jag248 was chosen for further assays, due to its great potential for applications in bioremediation. Jag248 was identified as *Bacillus* sp., and showed great effectiveness in soil and seawater oil clean up, being even better than the synthetic surfactants used for comparison. Jag248 tensoactive-molecule is probably an iturin, as demonstrated by its antifungal activity and also by the amplification of *ituD* and *lpa14* by PCR. This molecule was partially purified by HPLC and presented two low values for the formation of micelles, being most effective than commercial surfactants. This is the first study relating iturine to a relevant activity of surface tension reduction. Our results highlight that mangrove soils represent a rich source of known and new surface active molecules.

Keywords: Biosurfactants, Bioemulsifiers, Bioremediation, Mangrove Soil.

# Introdução

---



## 1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos representam as formas de vidas mais abundantes no planeta e sua diversidade global excede, em muito, a dos demais organismos vivos. Adaptados a praticamente todos os ambientes existentes na Terra, apresentam uma vasta diversidade metabólica. São capazes de decompor todos os químicos sintetizados por organismos vivos e são os principais responsáveis pela detoxificação de muitos contaminantes ambientais. Exercem, portanto, papéis essenciais para a funcionalidade dos ecossistemas.

As bactérias representam o grupo microbiano com maior plasticidade em seu metabolismo. Por serem unicelulares e apresentarem uma elevada razão superfície/volume celular, conseguem se multiplicar e se adaptar mais rapidamente que micro-organismos eucarióticos. A fácil adaptação bacteriana deve-se, em especial, à produção de exopolímeros e enzimas que viabilizam a utilização de diversos substratos como fonte de nutrientes e/ou a proteção contra compostos tóxicos à célula.

Dos ambientes naturais estudados para a busca de novos micro-organismos e genes, o solo é o que tem despertado mais interesse, por apresentar vasta diversidade microbiana. Estima-se que um grama de solo pode conter até 10 bilhões de células incluídos em cerca de quatro mil espécies diferentes. Neste contexto, os solos podem abrigar espécies cujos genes estejam envolvidos na produção de enzimas para degradação e transformação de vários compostos naturais e/ou xenobióticos.

Os manguezais, ecossistemas costeiros de transição entre o ambiente terrestre e marinho, têm se tornado foco de vários estudos nos últimos anos. Apresentam uma ampla diversidade de nichos, os quais envolvem alimentação, reprodução, refúgio, criação e desova para espécies locais e migratórias, sendo, portanto, vital para a manutenção dos ecossistemas adjacentes. Apesar desse conhecimento, pouco ainda se sabe sobre os micro-organismos de solos de manguezais, especialmente, a respeito de suas funções e potencialidades neste ambiente tão peculiar.

Os solos de manguezais são formados pela deposição de partículas orgânicas e inorgânicas de origem terrestre e marinha, que se movimentam em função das correntes das marés. Apresentam predominantemente frações finas como a argila e o silte, são pouco

consolidados e ricos em matéria orgânica. Os fatores abióticos que regem a formação do solo são também determinantes para o estabelecimento das espécies microbianas. Micro-organismos que colonizam esses solos estão naturalmente adaptados às mudanças bruscas de salinidade, oxigênio dissolvido, pH que ocorrem diariamente nesses ambientes. Desse modo, biomoléculas produzidas por essa microbiota tendem a ser mais estáveis sob condições ambientais oscilantes.

O grupo *Bacillus* está entre os mais pesquisados em microbiologia ambiental para aplicações industriais e biotecnológicas. Micro-organismos desse grupo são isolados principalmente do solo e sua importância se deve à diversidade de metabólitos produzidos, em especial, aos seus lipopeptídeos. Algumas dessas moléculas, os biossurfactantes, apresentam atividade tensoativa e são ecologicamente relevantes, pois atuam na solubilização de compostos hidrofóbicos, possibilitando a utilização de hidrocarbonetos por células microbianas. Alguns biossurfactantes também podem apresentar atividade emulsificante e antimicrobiana, por isso, encontram aplicação nas indústrias cosmética, alimentícia e farmacêutica.

A solubilização de derivados de petróleo por biossurfactantes tem despertado grande interesse atualmente, devido à eficácia, biodegradabilidade e baixa toxicidade dos surfactantes naturais frente aos surfactantes químicos. Entretanto, o custo elevado da produção desses metabólitos ainda se mostra como obstáculo para utilização em larga escala. Para vencer esse obstáculo, as pesquisas se concentram em testar o emprego de substratos de baixo custo, como resíduos industriais, e procurar por linhagens que produzam biossurfactantes cada vez mais eficazes e com elevado rendimento.

Diante dessa realidade, desde 2004 nosso grupo de pesquisa tem investido na prospecção e estudo de linhagens microbianas promissoras na produção de biossurfactantes e bioemulsificantes, bem como em soluções ambientalmente amigáveis para problemas que envolvam contaminação ocasionada por petróleo e derivados. Resultados bem sucedidos já foram alcançados como fruto desse esforço. Dentre eles, merecem destaque três patentes envolvendo bioprodutos para utilização em biorremediação e o Prêmio Petrobras de Tecnologia da Preservação Ambiental em 2009, pela pesquisa que utilizou

técnicas moleculares para avaliar os efeitos do acúmulo de petróleo nas comunidades microbianas do solo do manguezal da Baía de Todos os Santos.

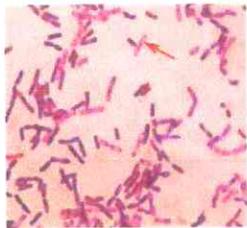
Nosso atual desafio tem sido conhecer os micro-organismos existentes nos solos dos manguezais da costa cearense e pesquisar nesta microbiota, atividades de elevado e relevante valor ambiental e biotecnológico. Com exceção do manguezal do Rio Timonha, na fronteira com o Piauí, todos os outros treze manguezais existentes no Ceará estão afetados por alguma forma de impacto tais como urbanização, contaminação por petróleo, esgotos domésticos ou industriais, carcinicultura, construção de barragens, erosão, etc. Esta realidade reforça a urgente necessidade de se conhecer a microbiota nativa e o papel destas espécies no equilíbrio ecológico dos manguezais, antes que essa valiosa biodiversidade seja perdida. Este conhecimento também é de fundamental importância para o planejamento e desenvolvimento de estratégias que visem à recuperação desses ambientes.

Trabalhos recentes têm demonstrado que solos de manguezais albergam micro-organismos produtores de biossurfactantes conhecidos e, possivelmente, novos compostos, tendo em vista a vasta diversidade microbiana não cultivável encontrada nesse ecossistema. Brito e colaboradores (2006) isolaram bactérias do gênero *Bacillus* de amostras de solo de manguezal contaminadas com hidrocarbonetos e estudaram o potencial das linhagens obtidas em produzir biossurfactantes. Dias e colaboradores (2009) também mostraram o potencial biotecnológico de bactérias cultiváveis provenientes de solos de manguezais, ressaltando a importância de um estudo mais aprofundado visando um aproveitamento dessa microbiota. Viramontes-Ramos e colaboradores (2010) relataram o isolamento de bactérias produtoras de surfactina de solos contaminados com hidrocarbonetos. A relação entre a ocorrência de bactérias produtoras de surfactantes e ambientes contaminados sugere um papel importante dessas moléculas na sobrevivência dos micro-organismos produtores nesses ambientes.

Neste sentido, o presente trabalho realizou uma busca por linhagens de bactérias produtoras de biossurfactantes em amostras de solo do manguezal do Rio Jaguaribe-CE, com o intuito de encontrar novas linhagens e/ou produtores mais eficazes.

# Objetivos

---



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

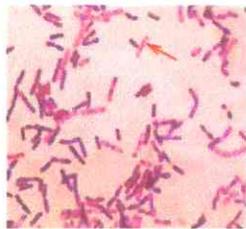
Isolar espécies de bactérias produtoras de compostos tensoativos a partir de solos de manguezal e selecionar aquelas mais promissoras, visando aplicações em biorremediação de ambientes contaminados com petróleo.

### **2.2. Objetivos específicos**

1. Isolar e selecionar linhagens com potencial para a produção de compostos tensoativos.
2. Identificar isolados produtores de biossurfactantes através da pesquisa de genes para esses compostos.
3. Identificar molecularmente os isolados selecionados.
4. Analisar os sistemas de biossurfactantes ou bioemulsificantes mais promissores.
5. Avaliar a eficiência dos compostos brutos e parcialmente purificados para limpeza de óleo da água e solo.
6. Verificar se os compostos tensoativos possuem atividade antifúngica.

# Revisão Bibliográfica

---

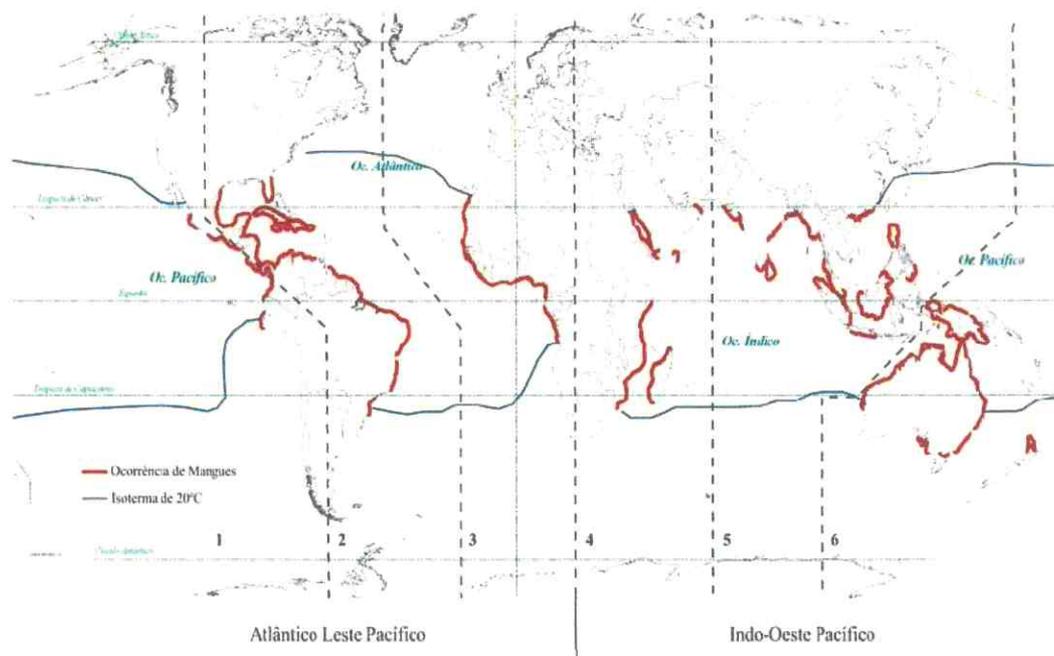


### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Importância ecológica dos manguezais

Manguezais são ecossistemas localizados predominantemente nas regiões tropical e subtropical, submetidos periodicamente a variações das marés. As mudanças sazonais que ocorrem nos manguezais atuam de forma a selecionar espécies vegetais e animais características desses ambientes. Entretanto, apesar da seletividade a que são submetidos, esses ecossistemas se destacam pela grande abundância das populações que neles vivem. Por isso são considerados um dos mais produtivos ambientes naturais (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995; DIAS et al., 2009).

Os manguezais estão restritos as latitudes entre 30° Norte e 30° Sul e apresentam ampla distribuição mundial, estando presentes em 112 países e territórios (Figura 1, destaque em vermelho). A grande influência exercida por fatores como umidade e temperatura, favoreceu a sua distribuição mais abundante nas Américas e na Ásia (KATHIRESAN & BINGHAM, 2001).



**Figura 1** - Distribuição dos manguezais no mundo. Destaque em vermelho (MAIA et al., 2005).

No Brasil, os manguezais ocorrem em 92% da linha de costa, perfazendo 6.800 km de forma quase contínua, iniciando no extremo norte no Oiapoque, no Estado do Amapá, e se estendendo até Santa Catarina. Apenas o Rio Grande do Sul não possui florestas de manguezais (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995).

Os mangues, vegetação típica dos manguezais, são altamente especializados e adaptados às condições de solos alagados, com baixas concentrações de oxigênio e salinidade variável. São representados por poucas espécies geralmente abundantes, como *Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa*, *Avicennia tomentosa* e *Avicennia schaueriana*. Partindo-se do oceano em direção ao continente, espécies de *Rhizophora* sp. têm sido amplamente relatadas como dominantes na região mais próxima ao mar, sujeitas a inundações periódicas. É facilmente reconhecida no ambiente devido às raízes-escora, que auxiliam a sua fixação. *Avicennia* sp., por outro lado, apresenta raízes aéreas denominadas pneumatóforos, que permitem a captura do oxigênio adjacente ao solo pouco aerado. Esse gênero do mangue encontra-se nas regiões menos sujeitas a inundações. Espécies de *Laguncularia* sp. apresentam em suas folhas glândulas de sal para eliminar o excesso dessa substância adquirido na água do ambiente. Essa vegetação é típica da porção mediana do manguezal (TOMLINSON, 1994; SAENGER, 2002; LACERDA et al., 2006).

Os solos de manguezais apresentam uma alta densidade de micro-organismos, os quais são os principais responsáveis pela degradação da matéria orgânica abundante nesse ecossistema. Em manguezais tropicais, bactérias e fungos constituem 91% da biomassa microbiana total, considerando que algas e protozoários representam apenas 7% e 2% respectivamente (ALONGI, 1988; BANO et al., 1997). O grande número de micro-nichos no solo e na água, como regiões de maior ou menor oxigenação no solo, teor de ferro, retenção de sais e concentração de matéria orgânica, favorecem o estabelecimento de uma enorme diversidade microbiana. Dentre alguns grupos que desempenham funções importantes podem ser citadas as bactérias redutoras de sulfato, decompositoras primárias em sedimentos anóxicos de manguezais; fixadoras de nitrogênio, que atuam na ciclagem de nutrientes; decompositoras de resíduos orgânicos; bactérias que auxiliam a estocagem de carbono, dentre outras (KATHIRESAN & BINGHAM, 2001; DIAS, 2008).

Embora existam muitos estudos que explorem o hidrodinamismo em manguezais e o efeito desse fenômeno nas comunidades de animais e plantas, pouco ainda se conhece a respeito da microbiologia desses ambientes. Neste contexto torna-se urgente o desenvolvimento de pesquisas que abordem quem são os micro-organismos ali presentes e o que eles fazem, antes que essa microbiota seja irremediavelmente afetada pelos impactos naturais e antrópicos que constantemente atingem esse ecossistema (CURY, TORRADO & LAMBAIS, 2002). Devido às oscilações de salinidade, temperatura e pH a que os manguezais são naturalmente expostos por causa das variações diárias de maré, especula-se que bactérias e fungos que nele residam tenham elevada plasticidade metabólica e genética. Dessa forma, os manguezais constituem uma fonte valiosa de novas espécies microbianas e de biomoléculas (KATHIRESAN & BINGHAM, 2001; ZHOU et al., 2006).

A prospecção de micro-organismos em manguezais, baseada em técnicas de cultivo, mostrou a ocorrência dos gêneros bacterianos *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Clostridium* e *Klebsiella* em amostras de solos, rizosferas e superfícies de raízes de várias espécies do mangue (SENGUPTA & CHAUDHURI 1990 e 1991). Linhagens microbianas resistentes a vários antibióticos também têm sido isoladas de manguezais (LE, MUNEKAGE & KATO, 2005), sugerindo a contaminação desse ecossistema com insumos utilizados na carcinicultura (LALUMERA et al., 2004), uma das atividades mais impactantes nos manguezais do Nordeste. Shome et al. (1995) isolaram trinta e oito bactérias distintas de folha de mangue e sedimentos de um manguezal no sul da Índia e caracterizaram essa comunidade bacteriana, como sendo na sua maioria Gram-positiva (76,3%), móveis (87%), fermentadores (82,1%), pigmentados (31%) e resistentes à polimixina B (100%) e cloranfenicol (50%).

O enfoque atual da ecologia microbiana de manguezais tem sido descrever a estrutura das comunidades presentes nos mais diversos micro-nichos e as funções de cada grupo microbiano dentro dessas comunidades. As metodologias utilizadas para se conhecer a microbiologia dos manguezais envolvem o cultivo, análises moleculares e estatísticas. A partir dessas ferramentas, tem-se tornado possível estabelecer a relação entre fatores ambientais e distribuição dos micro-organismos nesse ambiente (BOUILLON et al., 2004; BISWAS et al., 2007). Além disso, a prospecção microbiana em manguezais tem buscado

descobrir novas linhagens, cujo potencial metabólico possa ser explorado biotecnologicamente (DIAS et al., 2009).

### 3.2. O grupo *Bacillus*

O gênero *Bacillus* é formado por um grupo heterogêneo de bactérias Gram-positivas ou Gram-variáveis, aeróbicas, com formato de bastonete, que podem ocorrer isolados ou em cadeia, produtores de esporos resistentes a condições adversas, não apresentando mais de um esporo por célula (HOLT et al., 1994). Esses micro-organismos apresentam grande plasticidade fisiológica no que se refere às condições de temperatura, pH e salinidade dos ambientes nos quais são encontrados como água, solo, associadas às plantas, ambientes poluídos, sedimentos marinhos e etc. (ENCINAS et al., 1996). Estão atualmente distribuídos em mais de 100 espécies e representam um grupo importante e bastante diversificado, com uma extraordinária ecologia de interesse em vários segmentos da biotecnologia (EICHLER, 2001).

Devido à diversidade de espécies presentes no grupo *Bacillus*, a classificação e identificação de seus membros têm sido feita sob diferentes aspectos com a finalidade de se obter o maior número possível de informações a respeito das características celulares. Abordagens envolvendo propriedades fenotípicas como perfil bioquímico e fisiológico (SMITH et al., 1952), constituição dos ácidos graxos da membrana celular (KANEDA, 1977), produção de enzimas (BAPTIST, MANDEL & GHERNA, 1978), tipo e localização do endósporo (GORDON, HAYNES & PANG, 1973) e composição da parede celular (STACKEBRANDT et al., 1987), embora sejam bastante tradicionais, ainda continuam sendo utilizadas para classificar bactérias do grupo *Bacillus*. Métodos moleculares, os quais utilizam a análise do DNA total e da sequência do gene do rRNA 16S, no entanto, tem permitido uma classificação mais acurada. O desenvolvimento dessas metodologias tem permitido não apenas a re-classificação de espécies erroneamente nomeadas, como a descoberta de novas espécies dentro do grupo (FREITAS et al., 2008).

Um exemplo das modificações ocorridas após a adoção de métodos moleculares para classificação microbiana pode ser observado com o grupo *Bacillus subtilis*. Antes considerado apenas uma espécie, o grupo atualmente é constituído pelas espécies *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* e *B. licheniformis*, as quais estão estritamente

relacionadas de acordo com a análise genética. Membros desse grupo são utilizados na indústria para produção de enzimas, antibióticos, probióticos e têm sido pesquisados para futuras aplicações na biodegradação de xenobióticos e produção em larga escala de biossurfactantes (ONGENA & JACQUES, 2008).

### **3.3. Sistemas de biomoléculas produzidas por espécies de *Bacillus***

Bactérias do grupo *Bacillus* produzem uma variedade de compostos bioativos, em especial antibióticos de natureza lipopeptídica (ONGENA & JACQUES, 2008). Estruturalmente, os lipopeptídeos são formados por um peptídeo cíclico, geralmente composto por sete aminoácidos, ligados a uma cadeia de ácido graxo, o que confere a essas biomoléculas um caráter anfifílico, podendo interagir com superfícies e/ou substâncias de diferentes polaridades (STEIN, 2005; ONGENA & JACQUES, 2008). Devido a isto, os lipopeptídeos tornam-se fundamentais para os micro-organismos que os produzem, pois facilitam o estabelecimento destes em novos nichos, através da ligação e deslocamento em superfícies; a captura de substratos hidrofóbicos, desenvolvimento de biofilmes e do mecanismo de *quorum sensing*, o qual é definido como processo de comunicação entre e intra-espécies microbianas, que permite aos micro-organismos apresentarem alterações fenotípicas marcantes quando estes se encontram em altas densidades populacionais. Todas estas possibilidades de utilização dos lipopeptídeos garantem às bactérias produtoras destas biomoléculas verdadeiras vantagens ecológicas sobre as não produtoras (STEIN, 2005; MUKHERJEE & DAS, 2005; NIHORIMBERE et al., 2009).

Estudos sobre lipopeptídeos microbianos têm despertado interesse em várias áreas da ciência. Na área médica, tem sido pesquisado para o desenvolvimento de antibióticos, antitumorais e antivirais (CAMEOTRA & MAKKAR, 2004; RODRIGUES et al., 2006; DAS, MUKHERJEE & SEN, 2008); na agricultura, para o biocontrole de fitopatógenos economicamente relevantes (YU et al., 2002; ONGENA et al., 2007; ROMERO et al., 2007; ONGENA & JACQUES, 2008); na indústria cosmética, farmacêutica, de tintas e de alimentos, utilizados como emulsificantes e estabilizantes (KOSARIC, 1992; DESAI & BANAT, 1997; BANAT, MAKKAR & CAMEOTRA, 2000) na indústria de detergentes, para o desenvolvimento de fórmula biodegradáveis e menos tóxicas (MUKHERJEE, 2007) e na área ambiental, na biorremediação de ambientes contaminados com petróleo e

derivados, através do uso de biossurfactantes, moléculas anfifílicas com caráter tensoativo, menos dispendiosas e ecologicamente mais amigáveis que os surfactantes químicos (BOGNOLO, 1999; MULLIGAN, 2005; DAS & MUKHERJEE, 2007). As diversas formas de aplicação dos lipopeptídeos demonstram sua enorme versatilidade do grupo *Bacillus* (EICHLER, 2001).

Os lipopeptídeos de *Bacillus* compreendem três famílias: 1ª. Família, Iturina, formado pelas moléculas iturina A e C, bacilomicina D, F e L e micosubtilina; 2ª. Família, Surfactina, à qual pertencem liquenisina, pumilacidina, esperina e surfactina e 3ª Família, Fengicina, representada por fengicina A e B e por plipastatina A e B. As principais diferenças entre os membros dessas famílias residem no tipo de ligação da cadeia de ácido graxo ao peptídeo cíclico, na quantidade de carbonos da cadeia lipídica, e nos aminoácidos formadores do peptídeo (Tabela 1).

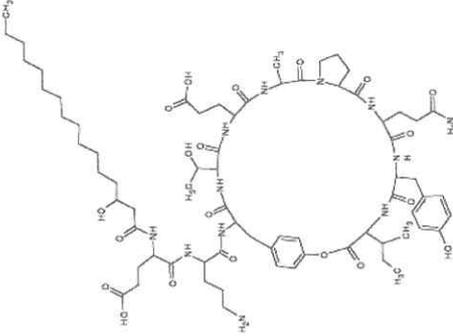
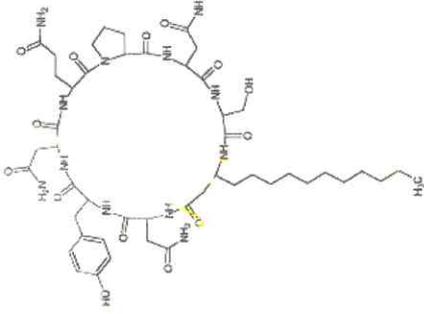
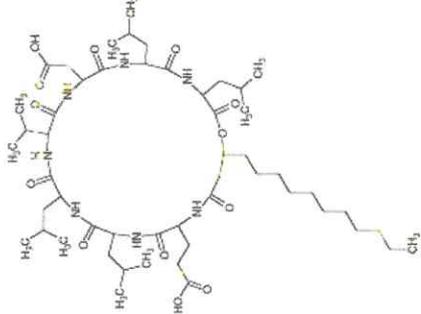
As pesquisas relacionadas à iturina e fengicina têm como foco principal a aplicação dessas moléculas no controle de fungos fitopatogênicos (ONGENA et al., 2007; ROMERO et al., 2007). Isto porque a estrutura molecular dessas substâncias permite que atuem como antagonistas diretos na inibição de fungos pela formação de canais iônicos excessivos na membrana celular (ONGENA & JACQUES, 2008). Em relação à surfactina, os estudos se concentram mais no seu potencial surfactante, o qual possibilita a aplicação desta molécula principalmente como tensoativo e emulsificante, embora também demonstre atividade antibacteriana (COOPER & ZAJIC, 1980).

Dentre os lipopeptídeos anteriormente citados, iturina A e surfactina estão atualmente entre os mais estudados. Baseado em um levantamento realizado em maio de 2011 na base de dados Scopus (<http://www.scopus.com/home.url>), utilizando nomes de lipopeptídeos produzidos por *Bacillus*, foram encontrados 108 artigos para a palavra “*fengycin*” (fengicina), 260 para “*iturin*” (iturina) e 657 para *surfactin* (surfactina). Ao utilizar “*lipopeptide*” (lipopeptídeo), 2.602 artigos encontram-se disponíveis, o que pode indicar o isolamento ou identificação apenas parcial das moléculas estudadas. Embora sejam moléculas de grande relevância econômica e industrial, como anteriormente descrito, percebe-se que muito ainda está por ser descoberto no que se refere à lipopeptídeos produzidos por *Bacillus*.

Espécies de *Bacillus* produtores de lipopeptídeos podem ser isoladas de diversas amostras ambientais, tais como solo, rizosfera, rizoplano, sedimentos de águas profundas (TRISCHMAN, JENSEN & FENICAL, 1994) e trato gastrointestinal humano (HONG et al., 2009). A biossíntese de algumas dessas moléculas, como iturinas, parece ser limitada a algumas espécies de *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*), enquanto que a surfactina e a fengicina tem sua produção mais generalizada entre múltiplas espécies, incluindo *Bacillus coagulans* (HUSZCZA & BURCZYK, 2006), *Bacillus pumilus* (KALINOVSKAYA et al., 2002), *Bacillus cereus* (TSUGE et al., 1999), *Bacillus thuringiensis* (KIM et al., 2004), *Bacillus mojavensis* (SNOOK et al., 2009), *Bacillus megaterium* (PUEYO et al., 2009), *Bacillus polyfermenticus* (KIM et al., 2009) e *Brevibacillus brevis* (HADDAD, WANG & MU, 2008).

Em um estudo comparativo de mais de 50 cepas de *B. subtilis* e *B. licheniformis* isoladas de sete ambientes diversos e extremos que vão desde a geleira até o deserto, Price e colaboradores (2007) descreveram uma correlação entre a produção de lipopeptídeos e a origem geográfica das estirpes. Isso levou os autores a especular que a especificidade de produção de lipopeptídeos permite uma melhor competição entre as populações de *Bacillus* e a comunidade microbiana indígena. Analisando sob uma perspectiva ecológica, a capacidade de *Bacillus* produzir estruturalmente diferentes tipos de lipopeptídeos pode permitir e favorecer uma resposta mais rápida e adequada às mudanças dos fatores abióticos do ambiente (RAAIJMAKERS et al., 2010).

Tabela 1 – Características gerais das famílias de lipopeptídeos de *Bacillus* (Adaptado de ONGENA & JACQUES, 2008).

Família	Fengicina	Iturina	Surfactina
<b>Moléculas representantes</b>	Fengicina A e B, Plipastatina A e B	Iturina A e C, Bacilomicina D, F e L e Micosubtilina	Liquenissina, Pumilacidina, Esperina e Surfactina
<b>Estrutura química dos principais representantes de cada família (Fengicina A, Iturina A e Surfactina)</b>			
<b>Variações da sequência de aminoácidos</b>	<p>Fengicina A: L-Glu-D-Om-D-Tyr-D-aThr-L-Glu-D-Ala-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile</p> <p>Fengicina B: L-Glu-D-Om-D-Tyr-D-aThr-L-Glu-D-Val-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile</p> <p>Plipastatina A: L-Glu-D-Om-L-Tyr-D-aThr-L-Glu-D-Ala-L-Pro-L-Gln-D-Tyr-L-Ile</p> <p>Fengicina A: L-Glu-D-Om-L-Tyr-D-aThr-L-Glu-D-Val-L-Pro-L-Gln-D-Tyr-L-Ile</p>	<p>Bacilomicina D: L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Pro-L-Glu-D-Ser-L-Thr</p> <p>Bacilomicina F: L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Thr</p> <p>Bacilomicina L: L-Asp-D-Tyr-D-Asn-L-Ser-L-Gln-D-Ser-L-Thr</p> <p>Iturina A: L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser</p> <p>Iturina C: L-Asp-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser</p> <p>Micosubtilina: L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Ser-L-Asn</p>	<p>Esperina: L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu-COOH</p> <p>Liquenissina: L-XL<sub>1</sub>-L-XL<sub>2</sub>-D-Leu-L-XL<sub>4</sub>-L-Asp-D-Leu-L-XL<sub>7</sub></p> <p>Pumilacidina: L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Leu-L-Asp-D-Leu-L-XP<sub>7</sub></p> <p>Surfactina: L-Glu-L-XS<sub>7</sub>-D-Leu-L-XS<sub>4</sub>-L-Asp-D-Leu-L-XS<sub>7</sub></p>
<b>Número de aminoácidos</b>	10 aminoácidos	7 aminoácidos	7 aminoácidos
<b>Principais propriedades</b>	Antifúngico potente, principalmente contra fungos filamentosos	Atividade hemolítica, antifúngico	Biosurfactante, atividade antiviral, antibacteriana e hemolítica
<b>Micro-organismos produtores</b>	<i>B. subtilis</i> (JACQUES et al., 1999), <i>B. cereus</i> (TSUGE et al., 1999), <i>B. thuringiensis</i> (KIM et al., 2004) e <i>B. amyloliquefaciens</i> (KOUMOUTSI et al., 2004)	<i>B. subtilis</i> (BONMATIN; LAPRÉVOTE; PEYPOUX, 2003), <i>B. amyloliquefaciens</i> (KOUMOUTSI et al., 2004) e <i>B. circulans</i> (DAS et al., 2008)	<i>B. subtilis</i> (MIZUMOTO; HIRAI; SHODA, 2007), <i>B. coagulans</i> (HUSZCZA & BURCZYK, 2006), <i>B. pumilus</i> e <i>B. licheniformis</i> (PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999)

### 3.3.1. Biossurfactantes e bioemulsificantes

Os compostos ativadores de superfície (SACs, do inglês *Surface Active Compounds*) conhecidos como biossurfactantes são, em geral, compostos anfifílicos de baixo peso molecular que tem a capacidade de formar micelas. Sua parte hidrofóbica é formada por hidrocarbonetos com cerca de 10 a 18 átomos de carbono, mas podem ser encontradas cadeias de ácidos graxos ligadas a proteínas ou peptídeos. A parte hidrofílica é variável, podendo ser carboidrato, éster, hidroxila, fosfato ou grupo carboxílico. Em geral, biossurfactantes de baixo peso molecular (glicolipídeos e lipopeptídeos) são capazes de reduzir a tensão superficial de líquidos, mas não formam emulsões estáveis. Em contrapartida, os biossurfactantes de alto peso molecular, chamados bioemulsificantes, são menos eficazes na diminuição da tensão superficial. Porém, a maioria deles é capaz de formar emulsões estáveis, através da dispersão de uma fase líquida em outra de diferente polaridade, como óleo-em-água ou água-em-óleo. Dessa forma, nem todos os biossurfactantes são bioemulsificantes (NEU, 1996; RON & ROSENBERG, 2001; NITSCHKE & PASTORE, 2002; VIRAMONTES-RAMOS et al., 2010).

Os biossurfactantes e os bioemulsificantes são sintetizados por bactérias, leveduras e fungos filamentosos durante o crescimento em diferentes fontes de carbono, desde substâncias hidrofílicas como a glicose, até substratos hidrofóbicos como os hidrocarbonetos (ROSENBERG & RON, 1999; MULLIGAN, 2005). O principal papel fisiológico atribuído aos biossurfactantes é permitir que os microrganismos cresçam em substratos imiscíveis em água, pela redução da tensão superficial, tornando-o mais disponível para a captação e metabolismo. Os microrganismos podem aumentar a taxa de captação e biodegradação como resultado da produção de biossurfactantes ou emulsificantes. Primeiramente, eles podem efetivamente aumentar a solubilidade do composto orgânico através da formação de micelas ou vesículas que se associam com os hidrocarbonetos. A seguir, podem facilitar o contato das células ao hidrocarboneto, transformando a superfície celular para mais hidrofóbica, com maior atração pelas gotículas emulsificadas de óleo (MAIER, 2003; BENTO, CAMARGO & GAYLARDE, 2008).

A produção de biossurfactantes e bioemulsificantes geralmente tem sido associada com o crescimento celular em meios de cultura ou em meios mínimos (mineral) com a fonte de carbono (solúvel ou insolúvel) a ser investigada. Alguns autores reportam a redução da tensão superficial do meio na fase exponencial de crescimento (WILLUMSEN & KARLSON, 1997) e muitos outros apenas na fase estacionária, sendo considerados por muitos autores como metabólitos secundários (WILLUMSEN & KARLSON, 1997; DESAI & BANAT, 1997; RON & ROSENBERG, 2002; PRUTHI & CAMEOTRA, 2003). Os bioemulsificantes são geralmente produzidos quando as culturas atingem a fase estacionária de crescimento. Em vários casos foi demonstrado que a produção de emulsificantes é induzida por sinais moleculares envolvendo *quorum-sensing*. Esta característica regulatória parece ser geral e provavelmente se aplica a produção de ambos os emulsificantes de alto e baixo peso molecular (RON & ROSENBERG, 2001; BENTO, CAMARGO & GAYLARDE, 2008).

A capacidade de produção dessas biomoléculas confere aos micro-organismos diversas vantagens no ambiente. Uma vez produzidos, os biossurfactantes podem ser liberados para o meio ou podem permanecer na superfície celular microbiana. Quando ficam retidos na parede, essas biomoléculas auxiliam no transporte de substratos insolúveis através da membrana. Quando excretados, são capazes de emulsionar e solubilizar hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, permitindo o crescimento e desenvolvimento desses micro-organismos em substratos de natureza apolar. Além dessa função, influenciam também a adesão e liberação da célula a superfícies e podem apresentar atividade antibiótica (BOSCH, 1988; NITSCHKE & PASTORE, 2002; MANEERAT & PHETRONG, 2007; VIRAMONTES-RAMOS et al., 2010).

O estudo dos biossurfactantes vem se intensificando nas últimas décadas, frente às diversas vantagens oferecidas por eles quando comparados aos surfactantes sintéticos. Dentre as principais vantagens, temos a biodegradabilidade dessas moléculas, a menor toxicidade para o meio ambiente, a biocompatibilidade, permitindo sua aplicação em cosméticos, medicamentos farmacêuticos e em aditivos na indústria alimentícia, e sua alta especificidade, podendo atuar na detoxificação de um poluente específico em determinado ambiente (RAHMAN & GAKPE, 2008). Além disso, surfactantes de origem natural

apresentam uma ampla variedade de estruturas e demonstram eficácia em condições extremas de temperatura, pH e salinidade (BENTO, CAMARGO & GAYLARDE, 2008).

Muitos dos biossurfactantes já descobertos são úteis para aplicações industriais. Os lipopeptídeos produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*, são ecológica e industrialmente relevantes. Eles podem atuar como sinalizadores químicos na formação dos biofilmes, de modo a controlar a densidade das populações microbianas; como antimicrobianos, atuando na diversidade de espécies de micro-organismos nas comunidades, além de auxiliar o processo de biorremediação natural de ambientes impactados por hidrocarbonetos (RON & ROSENBERG, 2001; ONGENA et al., 2007).

As pesquisas relacionadas à surfactina, biossurfactante mais potente produzido por *Bacillus*, exploram sua excepcional atividade surfactante para atuar como antibacteriano, emulsificante, anti-espumante e tensoativo. Esse lipopeptídeo foi inicialmente descrito por Arima, Kakinuma e Tamura, em 1968 e foi assim denominado devido a seu caráter tensoativo bastante evidente, o qual somente começou a ser explorado a partir de 1980 (PEYPOUX, BONMATIN & WALLACH, 1999). Em concentrações de 0,005%, a surfactina reduz a tensão superficial da água de 72,0 mN/m para 27,0 mN/m (COOPER & ZAJIC, 1980). Embora tenha sido descoberta há 43 anos, pesquisas à respeito desta molécula e dos micro-organismos produtores ainda são bastante intensas. Isto se deve, especialmente, à demanda crescente por biossurfactantes efetivos, economicamente viáveis, que possam ser utilizados em substituição aos surfactantes químicos, para recuperação de áreas contaminadas por derivados de petróleo (BANAT et al., 2010). Após a descoberta da surfactina, o gênero *Bacillus* passou a ser bastante visado em pesquisas relacionadas à produção de biossurfactantes, sendo crescente a procura por novas fontes dessas biomoléculas que apresentem alta eficácia e rendimento, aliado a um baixo custo de produção.

A surfactina produzida por *Bacillus subtilis* é composta por um heptapeptídeo cíclico (Glu-Leu-D-Leu-Val-Asp-D-Leu-Leu) ligado a uma porção de ácidos graxos com 13 a 15 átomos de carbono, sendo o ácido 3-hidroxi-13-metiltetradecanóico como principal componente. O sistema de biomoléculas da surfactina é produzido durante a transição da fase exponencial para a fase estacionária, por via não-ribossomal, por um complexo

enzimático formado por três proteínas: surfactina sintetase, acil transferase e a fosfopanteteinil transferase. Estudos bioquímicos de moléculas da família Surfactina revelam que seus membros diferem entre si somente nos resíduos de L-aminoácidos, nas posições 2, 4 e/ou 7 e que a posição 4 é que apresenta a maior variabilidade (PEYPOUX, BONMATIN & WALLACH, 1999; RAAJIMAKERS et al., 2010).

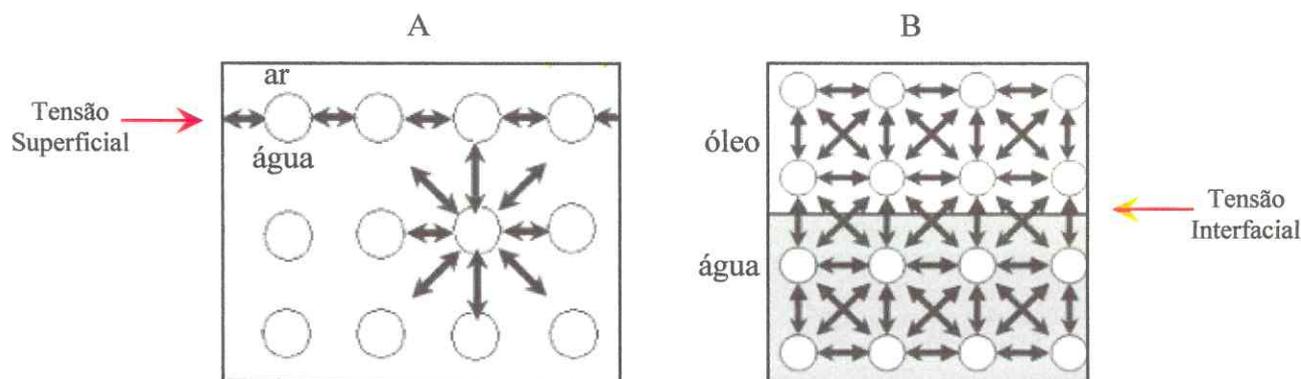
Apesar de bastante promissoras, a utilização de biossurfactantes microbianos em larga escala ainda encontra-se em fase incipiente. Os motivos pelos quais essas moléculas ainda não são amplamente utilizadas são o alto custo de produção associado ao uso de substratos caros, os métodos de recuperação dos produtos nem sempre eficientes e o baixo rendimento por parte das cepas produtoras. Segundo Hsieh e colaboradores (2004), apenas 20 linhagens de *Bacillus*, de bancos públicos e privados, têm sido registradas como produtoras de surfactina. Para fins científicos, a surfactina padrão é comercializada por R\$ 78,30/mg, e a iturina por R\$ 491,00/mg (SIGMA). A fengicina ainda não é comercializada. Os valores elevados tornam urgente a busca por novas cepas produtoras desses e de outros lipopeptídeos, os quais, embora ainda não sejam comercializados, certamente possuem aplicações relevantes.

#### **3.3.1.1. Propriedades funcionais dos biossurfactantes e bioemulsificantes**

Para propósitos práticos, é importante distinguir dois termos empregados na caracterização de biossurfactantes: eficiência e eficácia. A eficiência diz respeito à concentração de biossurfactante requerida para produzir uma significativa redução da tensão superficial da água, enquanto que a eficácia está relacionada ao mínimo valor ao qual a tensão pode ser reduzida. Com esse enfoque, para caracterizar biossurfactantes e bioemulsificantes faz-se necessário uma análise das propriedades de redução das tensões superficial e interfacial, da atividade emulsificante e desemulsificante da concentração micelar crítica (CMC) (LEE et al., 2008; VAN HAMME & URBAN, 2009).

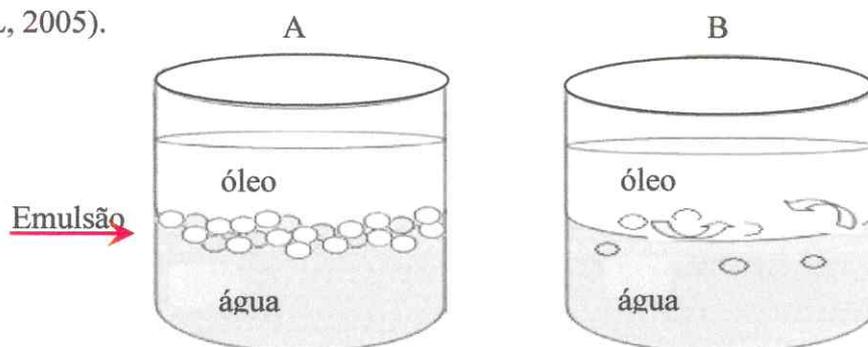
Denomina-se tensão superficial e interfacial o efeito de forças coesivas entre moléculas de água, de modo que estas permaneçam unidas fortemente (Figura 2A e 2B). Na tensão superficial, as forças se acumulam na interface ar-água, enquanto que na tensão interfacial, entre óleo e água. Esse parâmetro revela sua importância quando se pretende

comparar efeitos de diversos tensoativos. Os melhores serão aqueles que em menores concentrações apresentarem reduções significativas nos valores de tensão superficial ou interfacial (TANIYAVARN et al., 2003).



**Figura 2** – Organização das moléculas na (A) tensão superficial e (B) interfacial (Adaptado de Satpute et al., 2010).

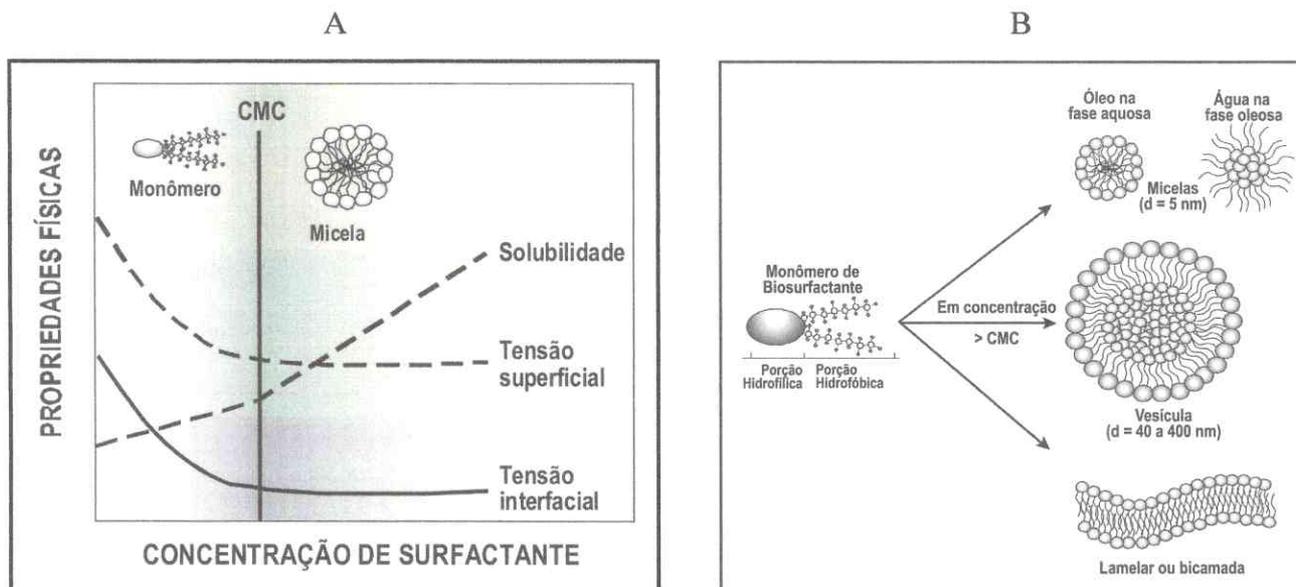
A dispersão de um líquido em outro, na forma de gotas microscópicas, levando à mistura de dois líquidos imiscíveis é o que caracteriza uma emulsão (Figura 3A). As emulsões representam uma grande área interfacial e se formam à medida que a tensão é reduzida, e a estabilidade dependerá da natureza do emulsificante e das condições do meio (MAIER, 2003). A desemulsificação, por outro lado, é a quebra de emulsões através do rompimento da superfície estável entre as fases (Figura 3B). O poder desemulsificante conferido a alguns biossurfactantes encontra importante aplicabilidade na extração de petróleo, para desfazer as emulsões de água e óleo, que são formadas durante a recuperação do óleo da rocha-matriz (NADARAJAH, SINGH & WARD, 2002; BOSCH & AXCELL, 2005).



**Figura 3** – Ilustração dos processos de (A) emulsificação (B) desemulsificação (Adaptado de Satpute et al., 2010).

A concentração micelar crítica, conhecida como CMC diz respeito à menor quantidade do biossurfactante necessário para a formação de micelas. Uma vez atingida a CMC, a tensão superficial ou interfacial não sofrerá mais nenhuma redução. Acima dessa concentração, as moléculas do tensoativo formam grandes agregados moleculares de dimensões coloidais (Figura 4). A esses agregados, que geralmente contém de 60 a 100 moléculas do tensoativo, dá-se o nome de micelas. Geralmente, em solução aquosa, as moléculas dos surfactantes agregam-se formando uma esfera com caudas hidrofóbicas voltadas para o seu interior e os grupos hidrofílicos ou carregados, voltados para fora. Abaixo da CMC, o tensoativo está predominantemente na forma de monômeros. A CMC depende da estrutura do surfactante (tamanho da cadeia do hidrocarboneto) e das condições do meio (concentração iônica, contra-íons, temperatura etc.). A formação de micelas está associada com a solubilização de compostos hidrofóbicos em água. Tradicionalmente, os métodos envolvidos para a determinação da CMC são tensão superficial, condutividade elétrica e espectrometria (MANIASSO, 2001; MORAES & REZENDE, 2004; CORRER et al., 2007, BENTO, CAMARGO & GAYLARDE, 2008).

A presença de surfactantes em meios aquosos provoca a redução da tensão superficial. Baseado neste fenômeno, a medida de tensão pode ser utilizada para determinação da concentração micelar crítica. Na prática, essa concentração é encontrada quando a tensão superficial permanece estável, independente da adição de surfactantes, momento no qual as micelas predominam no sistema (Figura 4) (PACWA- PŁOCINICZAK et al., 2011).



**Figura 4** – (A) Relação das variações de tensão superficial e interfacial com a concentração de surfactante no sistema. (B) Formas de organização das moléculas de biosurfactante acima da concentração micelar crítica (BENTO, CAMARGO & GAYLARDE, 2008).

Na determinação da CMC por medida de condutividade, método escolhido neste trabalho, pode-se determinar no ponto de modificação da condutividade, a transição do estágio de monômero para micela do tensoativo. Antes da CMC, a variação da condutividade é devida à adição de moléculas do tensoativo à solução. Após a CMC, a variação da condutividade deve-se ao aumento de micelas no meio (MORAES & REZENDE, 2004).

O método de análise da CMC por espectroscopia de absorção UV-VIS baseia-se na variação do espectro de absorção do corante Sudan III (504nm) em função da concentração do tensoativo. Aumentando-se a concentração de surfactante, há formação de micelas, as quais irão solubilizar o corante, modificando o comportamento da curva de absorção. O ponto máximo da curva indica o valor da CMC (MORAES & REZENDE, 2004).

### 3.3.1.2. Métodos de estudos para detecção de biossurfactantes

A maioria das metodologias para detecção de micro-organismos produtores de biossurfactantes tem sido realizada cultivando-se as linhagens microbianas em meios indutores para produção dessas moléculas. No caso de bactérias do grupo *Bacillus*, os meios têm, preferencialmente, glucose como fonte de carbono, além da fonte de nitrogênio, vitaminas e alguns metais traço como ferro, manganês. Embora os biossurfactantes sejam moléculas que viabilizam a captura de hidrocarbonetos, no caso de *Bacillus*, eles são bem produzidos mesmo em meios que não apresentem compostos hidrofóbicos. (ONGENA & JACQUES, 2008) Em geral, os principais fatores que influenciam a produção de biossurfactantes são o pH, salinidade do meio, fonte de carbono e nitrogênio (RAHMAN & GAKPE, 2008; PRIYA & USHARANI, 2009). No caso da surfactina, outros fatores como a concentração e fonte de ferro e manganês, e a concentração de oxigênio também podem influenciar a produção dessa molécula (WEI & CHU, 1998; WEI & CHU, 2002).

Os métodos que dependem de cultivo se baseiam nas mudanças da tensão superficial ocorridas nos meios de cultura após 24 à 48 h de crescimento, para pesquisar quais as linhagens tem potencial para produzir biossurfactantes e/ou bioemulsificantes. Desse modo, verifica-se a produção de agentes tensoativos pela medida das tensões superficiais antes e depois do cultivo e avalia-se a presença de substâncias emulsificantes por ensaios de emulsificação com hidrocarbonetos. Metodologias de cultivo mais recentes utilizam pequenas frações dos sobrenadantes, analisadas em placa multi-poços, caracterizando ensaios *high-throughput*. Embora tenham execução mais rápida, estas metodologias são de difícil reprodutibilidade (RAHMAN & GAKPE, 2008).

Iniciando o estudo de bactérias produtoras de biossurfactantes baseado em métodos moleculares, Hsieh e colaboradores (2004) propuseram a pesquisa de genes para produção de surfactina em linhagens de *Bacillus* através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando iniciadores específicos para o gene *sfp*, responsável pela produção de enzimas relacionadas à síntese da surfactina. O gene *sfp* é formado por 675 pares de bases.

Bento, Camargo e Gaylarde (2008) relacionaram diferentes metodologias para detectar a produção de biossurfactantes por isolados microbianos. Youssef e colaboradores (2004) compararam os métodos existentes, relacionando suas vantagens e desvantagens. E mais recentemente, Satpute e colaboradores (2010) publicaram uma longa revisão sobre métodos para investigar micro-organismos produtores de biossurfactantes e bioemulsificantes. Dentre as metodologias mais utilizadas, encontram-se:

a) **Método do anel de Noüy** – Amplamente utilizado por sua fácil reprodutibilidade e capacidade de detecção da presença de biossurfactantes de qualquer natureza. Mede a força necessária para romper a tensão superficial, através da retirada de um anel de platina imerso no sobrenadante da cultura. Exige a medida de tensão superficial e amostras à temperatura de 30 °C (Du NOÛY, 1925).

b) **Teste do Colapso da Gota** – O teste é realizado adicionando-se uma gota do sobrenadante livre de células sobre uma gota de óleo previamente estabilizada por 24h em uma superfície lisa de polipropileno. Caso haja a produção de biossurfactante pela cultura testada, haverá o colapso da gota do sobrenadante quando em contato com a gota de óleo. Em suspensões sem surfactante a gota do sobrenadante permanece em sua forma original. Para amostras contendo baixas quantidades de biossurfactantes o teste pode indicar falso-negativo, devido sua baixa sensibilidade (JAIN et al., 1991; BODOUR & MILLER-MAIER, 1998).

c) **Teste da microplaca** – Baseia-se na distorção óptica causada pela presença de biossurfactantes em solução aquosa. Consiste em adicionar 100 µL do sobrenadante da cultura livre de células em uma microplaca de poliestireno (superfície hidrofóbica) e visualizar contra um fundo quadriculado. O efeito de molhabilidade do biossurfactante faz com que a superfície do líquido pareça côncava, como lente divergente (VAUX & COTTINGHAM, 2001).

d) **Teste do espalhamento do óleo** – Também conhecido como *oil spreading* este ensaio consiste em adicionar 10 µL de sobrenadante livre de células sobre um filme de 20 µL de óleo cuidadosamente depositado na superfície de 50 mL de água, em uma placa de Petri. A formação de halos de ruptura do óleo indica a presença de tensoativos na amostra. É

considerado um dos melhores testes para detectar micro-organismos produtores de biossurfactantes (MORIKAWA, HIRATA & IMANAKA, 2000).

d) **Lâmina de vidro inclinada** – É uma técnica qualitativa, onde após o crescimento em placa, uma colônia do micro-organismo é misturada a uma gotícula de solução de Cloreto de Sódio 0,9% (m/v) e depositada sobre a extremidade de uma lâmina de vidro. Ao se inclinar a lâmina o movimento da gotícula indica a presença do biossurfactante. O teste é rápido e prático, mas apresenta a desvantagem de muitas vezes produzir resultados falso-positivos (PERSSON & MOLIN, 1987).

e) **Hemólise** – Baseia-se na propriedade que alguns biossurfactantes têm de lisar hemácias. Dessa forma, uma vez cultivadas em meio Ágar sangue, a presença do biossurfactante é detectada pela observação de halos ou zonas de hemólise ao redor das colônias. O teste apresenta como desvantagens o fato de não detectar todos os tipos de biossurfactantes e o fato de poder gerar falsos positivos, decorrentes da produção de enzimas como a hemolisina, que também ocasiona a formação dos halos (CARRILLO et al., 1996; SATPUTE et al., 2008).

f) **Análise do perfil da gota** - Consiste em adicionar 100 µl de uma cultura de bactéria após 12 h de crescimento, em uma superfície de *teflon*. A forma da gota é então acompanhada por vídeo, sendo esta um indicativo da presença/ausência do biossurfactante. Apresenta a vantagem de poder ser realizada com pequeno número de células, porém necessita de captação de imagem com câmera especial, avaliação do contorno da gota por até duas horas e software para conversão dos dados (VAN der VEGT et al., 1991).

g) **Índice de emulsificação (E24)** - Técnica bastante simples, consiste em adicionar 2 mL do sobrenadante livre de células a 2 mL de hidrocarboneto teste em um tubo de ensaio. Agita-se a solução por dois minutos em *vortex* e, após 24 h, realiza-se a leitura do resultado, dividindo-se a altura da emulsão formada pela altura do volume total da solução, multiplicando o resultado por 100. Este ensaio detecta a presença de emulsificantes no sobrenadante da cultura, bem como sua capacidade de formar emulsão com o hidrocarboneto testado (COOPER & GOLDEBERG, 1987).

h) **Camada de petróleo em agar** - Nesta técnica, o micro-organismo é cultivado em uma placa contendo agar coberto com petróleo e incubado por uma semana na temperatura desejada. A leitura do resultado positivo é dada pela presença de um halo de espalhamento de óleo ao redor da colônia, indicando a produção de biossurfactantes pela cultura testada. (MORIKAWA, ITO & IMANAKA, 1992).

Essas técnicas apresentam diversidade quanto à velocidade de resposta, reprodutibilidade e sensibilidade. A Tabela 2 apresenta um comparativo entre esses parâmetros.

**Tabela 2** – Comparação entre as principais técnicas de detecção de micro-organismos produtores de biossurfactantes. Análise qualitativa (++) = muito eficiente, (+) = eficiente; análise quantitativa (+) = sim, (-) = não; tempo: (min) = minutos, (h) = horas e (d) = dias; aplicação em alto desempenho: (+) = sim, (-) = não.

<b>Técnica</b>	<b>Análise qualitativa</b>	<b>Análise quantitativa</b>	<b>Velocidade</b>	<b>Técnica de alto desempenho</b>
Método do anel de Noüy	++	+	min	-
Colapso da gota	++	-	min	+
Microplaca	++	-	min	+
Espalhamento do óleo	++	-	min	-
Lâmina de vidro	+	-	min	-
Hemólise	+	-	d	-
Perfil da gota	+	-	h	+
Índice de emulsificação	++	-	d	-
Camada de petróleo em agar	+	-	d	-

### 3.4. Utilização de micro-organismos e seus produtos em biorremediação

O crescimento da indústria do petróleo tem ocasionado um rápido aumento no número de acidentes envolvendo derrame de óleo nas regiões costeiras e estuarinas. Esses acidentes decorrem principalmente das atividades de exploração, perfuração, produção, transporte, refino e distribuição nos quais grandes volumes de óleo estão envolvidos (SHIRAKAWA et al., 2001). O transporte de petróleo e derivados pode causar descargas

de portes variáveis, desde as maiores proporcionadas por acidentes com petroleiros até as relativamente pequenas, mas freqüentes, como descargas operacionais. Mundialmente o transporte lança no ambiente cerca de 100.000 toneladas de hidrocarbonetos por ano. Comparando-o a outras fontes de hidrocarbonetos e apenas às fontes antrópicas, este volume representa 7,7% e 14,3%, respectivamente, do total de hidrocarbonetos lançados anualmente no meio ambiente (WALKER et al., 2003). Em relação aos manguezais, os efeitos dos hidrocarbonetos do petróleo sobre a microbiota do solo são pouco conhecidos, mas sabe-se que estes xenobióticos podem persistir por mais de 20 anos, dada à lenta biodegradação limitada pela pouca oxigenação do ambiente (PEREIRA & GOMES, 2002).

Quando o petróleo é derramado no ambiente, vários processos físico-químicos e biológicos são passíveis de ocorrer e a intensidade de cada um deles varia ao longo do tempo. Dentre estes estão o espalhamento, a evaporação e a solubilização. Além disso, pode correr a emulsificação, caracterizada pela agregação e pelo aumento de peso e de volume de partículas; o fracionamento mecânico e a submersão, que consistem, respectivamente, na quebra e no afundamento de partículas devido a seu aumento de volume; a foto-oxidação, que pode transformar certos hidrocarbonetos em outras substâncias como os aldeídos (os quais são muito mais danosos que os produtos originais) e a biodegradação, que consiste na degradação do petróleo por ação microbiana (PEREIRA & GOMES, 2002). Em geral, quanto maior é o número de átomos de carbono do composto presente no petróleo, maior será sua persistência no ambiente, mais lenta sua evaporação e sua solubilidade (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005). Considerando que a biodegradação dos contaminantes está diretamente relacionada com o seu estado de dispersão, quando tratamos de substratos hidrofóbicos, estes precisam se tornar solúveis ou serem emulsionados, para serem degradados de maneira mais eficaz (MANEERAT & PHETRONG, 2007).

De todos os componentes presentes no petróleo, cerca de 60% a 90% é passível de biodegradação. Entretanto, o restante bruto ou refinado é recalcitrante. Mesmo tratando-se de uma fração menor (de 10% a 40%), deve-se ressaltar que isso significa toneladas de material poluente impactando o ambiente e podendo ser bioacumulado nos seres vivos. Assim, o destino dessas substâncias, após um derrame de óleo, dependerá da interação de vários fatores bióticos e abióticos (CRAPEZ et al., 2002).

As técnicas utilizadas para a remoção de hidrocarbonetos de ambientes impactados envolvem principalmente a utilização de redes de contenção física da mancha de óleo, bem como a aplicação de emulsificantes químicos que auxiliam na dissolução dos hidrocarbonetos. Apesar de minimizar os impactos dos danos causados pelo derrame de petróleo, essas técnicas ainda não são suficientes para a recuperação completa do ambiente, pois em muitos casos os resíduos dos poluentes ainda podem se acumular nos sedimentos, intoxicando muitos organismos (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

Os processos biológicos de descontaminação, representados de forma abrangente pelas técnicas de biorremediação, utilizam micro-organismos com capacidade de biodegradar xenobióticos, resultando em produtos com estrutura menos recalcitrante em relação à molécula original, ou na mineralização completa dos compostos tóxicos. Esta tecnologia tem sido vastamente estudada, pois além de ecologicamente correta, pode ser realizada *in situ* ou *ex situ*, por uma espécie ou por consórcios microbianos, os quais promovem o metabolismo integrado da estrutura alvo de biodegradação (MILLS et al., 2003). A biorremediação pode ser realizada de duas formas. Na primeira delas, o bioestímulo, a microbiota autóctone é estimulada pela adição de nutrientes no ambiente, em especial nitrogênio, fósforo e potássio. Na segunda, o bioaumento, micro-organismos são adicionados ao local contaminado, a fim de aumentar o potencial de biodegradação dos poluentes (TYAGI, FONSECA, CARVALHO, 2011). Todavia, qualquer tentativa de aplicação das técnicas de biorremediação *in situ* requer um conhecimento prévio da comunidade microbiana autóctone, do seu potencial de biodegradação, bem como das condições ambientais predominantes na área contaminada (IWAMOTO & NASU, 2001).

Qualquer que seja o processo de biorremediação escolhido, a etapa limitante diz respeito à disponibilidade do poluente para ser biodegradado. Alguns hidrocarbonetos do petróleo, pertencentes às frações pesadas, como asfaltenos e piches, adsorvem fortemente na matriz do solo e apresentam baixa solubilidade, fatores que dificultam ou até impedem o acesso microbiano a essas substâncias. Uma das estratégias para contornar este problema refere-se à aplicação de surfactantes nos ambientes contaminados, promovendo o aumento da solubilidade dos hidrocarbonetos, e da superfície de contato entre estes e as células microbianas, através da pseudo-solubilização dos compostos hidrofóbicos e da formação de micro-emulsões (MÓRAN et al., 2000; VAN HAMME & URBAN, 2009).

Biossurfactantes de origem microbiana têm sido intensamente pesquisados para substituir, em um futuro próximo, os surfactantes químicos e atenuar os efeitos que estes causam no ambiente. Diversidade estrutural, biodegradabilidade, estabilidade, seletividade e baixa concentração micelar crítica são os principais atrativos que favorecem a escolha dessas moléculas ao invés de tensoativos químicos. A literatura relata que ramnolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa* e o bioemulsificante denominado Emulsan, sintetizado pela cepa *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 já estão comercialmente disponíveis (SUTHAR et al., 2008; BANAT et al., 2010). No entanto, os custos elevados de produção, decorrentes dos substratos utilizados para sua síntese, das etapas de purificação e dos baixos rendimentos, ainda impedem que outros biossurfactantes tão eficientes quanto os descritos, sejam fabricados em larga escala (MUKHERJEE, DAS & SEN, 2006; THAVASI et al., 2008; BANAT et al., 2010).

A utilização de micro-organismos ou de seus produtos também poder aplicada para a recuperação melhorada do petróleo (MEOR - *Microbial Enhanced Oil Recovery*). A aplicação desta estratégia tem sido investigada em várias etapas que envolvem desde a extração do petróleo da rocha, utilizando surfactantes microbianos ou linhagens produtoras dessas moléculas, até a etapa de refino do óleo, onde a atividade enzimática microbiana é mais requisitada (Tabela 3). Tecnologias envolvendo MEOR têm sido intensamente pesquisadas visto que os métodos tradicionais de recuperação do petróleo conseguem retirar apenas 40 a 45% do óleo aprisionado nas rochas (BANAT et al., 2010) Atualmente, mais de 400 testes em MEOR estão em desenvolvimento nos Estados Unidos, utilizando várias espécies microbianas, dentre as quais se destacam cepas de *Xanthomonas campestris*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Desulfotribrio desulfuricans*. Os resultados são bastante animadores, quando se observa que por injeção dessas bactérias em tanques de estocagem de óleo consegue-se recuperar em torno de 30 a 200% a mais desse produto (SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007).

**Tabela 3** – Aplicações da recuperação melhorada do petróleo por ação microbiana (MEOR). (Adaptado de Ward et al., 2009)

<b>Aplicação</b>	<b>Processos</b>	<b>Micro-organismos/biocatálise</b>	<b>Atividades microbianas</b>
<b>Recuperação de óleo</b>	Recuperação do petróleo	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Xanthomonas campestris</i> <i>Zymomonas mobilis</i>	Produção de biossurfactantes auxilia na dissolução, redução da viscosidade, aumento da permeabilidade e da pressão
	Desemulsificação	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Corynebacterium petrophilum</i> <i>Nocardia amarae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Rhodococcus globerulus</i>	Desemulsificação de emulsões contendo óleo, redução da viscosidade e molhabilidade
	Outras aplicações de recuperação de óleo	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Recuperação de óleo cru de tanques utilizando biossurfactantes
<b>Bio-refino e bioprocesso</b>	Biodesulfurização	<i>Agrobacterium</i> MC501 <i>Arthrobacter</i> sp. <i>Corynebacterium</i> sp. SY1 <i>Gordona</i> CYKS1 <i>Nocardia</i> sp. <i>Rhodococcus erythropolis</i> H2 <i>Rhodococcus</i> sp. IGTS8	Remoção seletiva de enxofre de óleo cru ou de produtos de refino
	Biodesnitração	<i>Comamonas acidovorans</i> <i>Nocardioides</i> sp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas ayucida</i> <i>Rhodococcus</i> sp.	Remoção de nitrogênio
	Biodesmetalização	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Caldariomyces fumago</i> <i>Escherichia coli</i>	Remoção enzimática de Ni e V de óleo cru utilizando enzimas específicas
	Bioprocesso	Mono-oxigenases Di-oxigenases Lipoxigenases Peroxidases	Biotransformação de componentes do petróleo em produtos químicos finos

<b>Biodegradação e biorremediação</b>	Biorremediação	<i>Acinetobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Rhodococcus</i> spp. <i>Sphingomonas</i> spp. Alguns fungos	Emulsificação através da aderência aos hidrocarbonetos e dispersão
	Monitoramento de sítios contaminados	<i>Pseudomonas fluorescens</i> HK44 <i>Pseudomonas putida</i> RB1401	Biossensores bacterianos em sítios contaminados e em processo de biorremediação
	Biofiltração	<i>Acinetobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Rhodococcus</i> spp. <i>Sphingomonas</i> spp.	Biodegradação de hidrocarbonetos voláteis
	Remoção biológica de H <sub>2</sub> S	<i>Thioalcalobacteria</i> spp. <i>Thiobacillus</i> spp. <i>Thiocalovibrio</i> spp. <i>Thiomicrospira</i> spp.	Biotransformação de H <sub>2</sub> S a enxofre elementar e sulfato

No caso de micro-organismos produtores de biossurfactantes, a MEOR pode ser utilizada em três estratégias. A primeira delas envolve a produção *off site* dessas biomoléculas, em reatores, com subsequente adição aos reservatórios de óleo. Esta técnica é considerada a mais factível, embora ainda demande maior custo de produção. A segunda corresponde à injeção de micro-organismos alóctones produtores de biossurfactantes no local a ser tratado e a terceira diz respeito à adição de nutrientes no reservatório para estimular a produção de tensoativos pela microbiota indígena (SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007; BANAT et al., 2010). Dentre os biossurfactantes mais pesquisados para essas aplicações, destacam-se os ramnolipídeos, os lipopeptídeos surfactina e liquenisina e o emulsan (SEN, 2008).

Os micro-organismos capazes de degradar hidrocarbonetos estão largamente distribuídos nos oceanos e nas regiões estuarinas, tanto na água quanto nos solos de áreas impactadas por óleo, como em manguezais contaminados. A existência de micro-organismos capazes de degradar os hidrocarbonetos do petróleo utilizando-os como fonte de carbono foi demonstrada primeiramente por Zobell (1964), que observou que esses organismos eram amplamente distribuídos na natureza. Populações de bactérias hidrocarbonoclasticas em sedimentos contaminados por óleo são até dez vezes maiores do

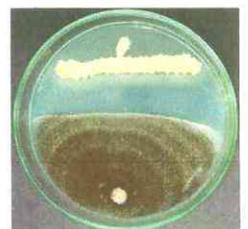
que nos não-contaminados (ATLAS, 1995; BRADDOCK et al., 1996). *Alcanivorax borkumensis*, *Pseudomonas putida*, *Methylobium petrophilum*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Dechloromonas aromática*, estão dentre as bactérias consideradas como excelentes biodegradadoras (WARD et al., 2009).

Em geral, micro-organismos que degradam hidrocarbonetos também apresentam genes para a produção de biossurfactantes. Portanto, é de se esperar que plasmídios para a produção de biossurfactantes sejam mais facilmente detectados em populações microbianas que habitam regiões contaminadas por derivados de petróleo (VAN HAMME, SINGH, WARD, 2003).

Tecnologias recentes de biorremediação vêm pesquisando a aplicação de micro-organismos imobilizados em suportes para biodegradar hidrocarbonetos. A principal vantagem desse método encontra-se no melhor monitoramento do metabolismo microbiano e, conseqüentemente, maior estabilidade operacional. Por estarem protegidas contra a ação tóxica do poluente, células imobilizadas são comprovadamente mais eficazes que células livres como agentes nos processos de biodegradação (BARRETO et al., 2010).

# Materials e Métodos

---



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

As linhagens microbianas estudadas neste trabalho foram isoladas de amostras do solo do manguezal do Rio Jaguaribe, Ceará, e encontram-se atualmente depositadas na coleção de bactérias do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBiotech) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

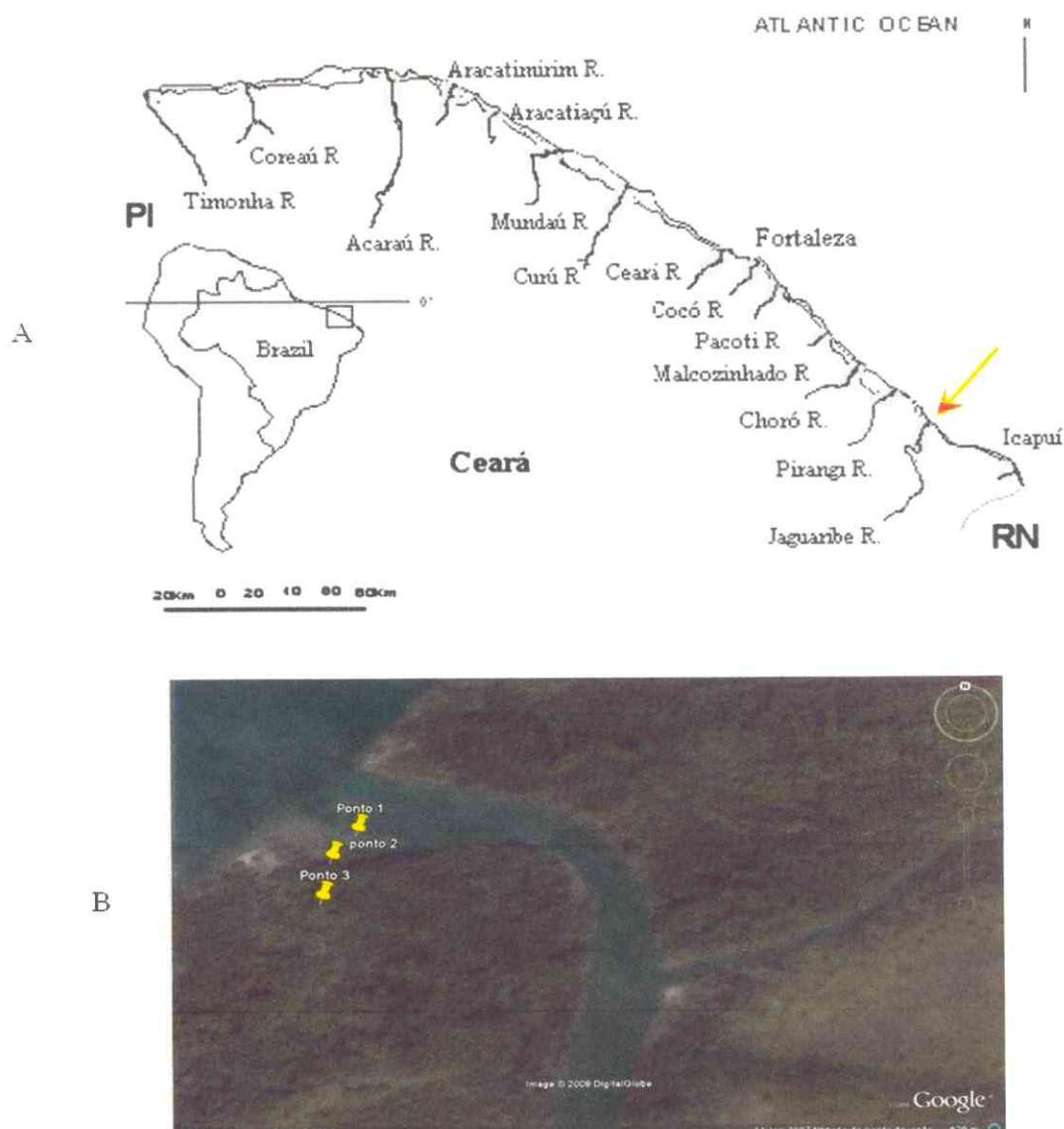
Os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico (PA) e a água utilizada no preparo de meios e soluções foi destilada (destilador Quimis 341-25) ou grau Milli-Q (Millipore).

O petróleo utilizado nas simulações dos experimentos de biorremediação foi coletado na Fazenda Belém em Icapuí-CE.

### 4.2. Metodologia

#### 4.2.1. Coleta do solo

As amostragens dos solos do manguezal foram realizadas durante maré de sizígia (amplitude 0,1) à profundidade de 0-10 cm. Foram estabelecidos três sítios de coleta ao longo do manguezal, partindo da proximidade do rio e seguindo em direção ao interior do continente. Os pontos foram marcados com o uso de um GPS portátil (Etrex H, GARMIN), sendo denominados P1(S 04°26,718' W 37°46,984'), situado nas proximidades do Rio Jaguaribe; P2 (S 04°26,731' W 37°46,985') na área colonizada pela espécie *Rhizophora mangle*; e P3(S 04°26,756' W 37°46,994') em uma área povoada por *Avicennia schaueriana* (Figura 5).



**Figura 5** – (A) Mapa dos estuários do Ceará, destacando em vermelho a localização do estuário do Rio Jaguaribe. (B) Imagem de satélite do estuário, mostrando os pontos de coleta no manguezal.

Em cada ponto, cinco amostras de solo foram retiradas em uma área de  $1 \text{ m}^2$ , com a utilização de um amostrador cilíndrico de PVC com 10 cm de diâmetro, e transferidas para frascos esterilizados. As amostras de solos foram conduzidas ao laboratório em uma caixa resfriada, mantendo a condição da temperatura em torno de  $4\text{-}8 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os solos frescos foram homogeneizados de maneira uniforme. Posteriormente, a mistura de solo obtida foi fracionada para duas finalidades. Uma amostra de 10g foi utilizada para isolamento dos micro-organismos e o restante, para caracterização físico-química.

#### 4.2.2. Análise dos parâmetros ambientais e caracterização das amostras de solos

Os parâmetros ambientais (temperatura, salinidade e pH) foram medidos *in situ* com a utilização de uma sonda multiparâmetro (YSI, modelo 85, USA) e um pHmetro (Hanna Instruments, HI 98107, Brasil).

A análise de granulometria foi realizada segundo a metodologia de peneiramento proposta por Suguio (1973). Inicialmente, sub-amostras do solo, reservadas exclusivamente para esta finalidade, foram secas a 60 °C, fracionadas em porções de 100g e, posteriormente, submetidas ao mecanismo de peneiramento úmido, onde há a separação da fração lamosa da arenosa (limites das classes = 0,062 mm de diâmetro). O material retido na peneira (fração arenosa) foi novamente seco a 60 °C e submetido ao peneiramento mecânico em um conjunto de 12 peneiras, onde se separam as classes arenosas e cascalhos (frações de 0,062 a 4,75 mm). As frações retidas em cada peneira foram pesadas e os dados analisados no programa de análise granulométrica ANASED 5j, desenvolvido pelo Laboratório de Geologia Marinha e Aplicada da Universidade Federal do Ceará. A classificação nominal do solo foi dada segundo Folk e Ward (1957) e os percentuais de areia, silte e argila, na escala de Wentworth (1922).

O teor de matéria orgânica foi determinado pelo método de perda de peso por ignição (PPI), descrito por Schulte e Hopkins (1996). As amostras de solo foram secas em estufa a 60 °C e postas em cadinhos, previamente secos em dessecador, em triplicatas de 0,5 g. As amostras foram colocadas em mufla a 550 °C por quatro horas. Após o resfriamento, as amostras foram novamente pesadas e o teor de matéria orgânica foi calculado pela fórmula:  $M.O (g/Kg) = [(M_i - M_f) / M_i] * 1000$ , na qual M.O é a matéria orgânica, M<sub>f</sub> é a massa após a combustão e M<sub>i</sub>, a massa inicial.

#### 4.2.3. Isolamento de linhagens produtoras de esporos

Para recuperação majoritária de bactérias do gênero *Bacillus*, utilizou-se a estratégia do aquecimento do solo a 80°C por 60 min, metodologia conhecida como *heat-test*. Esta técnica permite, através da utilização do calor como agente seletivo, a separação de bactérias produtoras de esporos termorresistentes, como *Bacillus*, dentre milhares de espécies existentes naturalmente no solo. Durante o aquecimento, células microbianas que

não apresentam esporos são destruídas, permanecendo apenas as linhagens de interesse neste trabalho, as quais podem ser recuperadas viáveis através de cultivo em meio sólido. Seguindo este método, o solo foi inicialmente aquecido e, em seguida, diluído seriadamente em NaCl 0,9% até  $10^{-4}$ . Alíquotas de 100  $\mu$ l de cada diluição foram inoculados em duplicata em meio ATGE (Agar Triptona, Glucose e Extrato de levedura, Difco – USA) e as placas incubadas a 30 °C por 48 h. As colônias com características culturais distintas foram sub-cultivadas em ATGE para obtenção de culturas puras. Os isolados foram caracterizados preliminarmente pela análise das colônias crescidas a 30°C em meio ATGE, e pela análise morfológica, através da visualização de lâminas por coloração de Gram. Após os estudos iniciais, os isolados foram estocados a -80 °C em Caldo Nutritivo (Difco – USA) contendo glicerol a 15%.

#### **4.2.4. Seleção de bactérias produtoras de biossurfactantes**

A seleção de espécies produtoras de tensoativos foi realizada através de cultivo em Meio Mineral (MORÁN et al., 2000, com modificações) contendo 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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 3,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 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. Ao meio pronto foi acrescido 0,1% (v/v) de solução de micronutrientes formada 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. Uma alíquota de 10% (v/v) da cultura em fase exponencial de crescimento, com absorbância ajustada para  $0,150 \pm 0,030$  ( $10^5$ - $10^6$  UFC/mL), foi utilizada como inóculo. As culturas foram incubadas sob agitação contínua de 150 rpm, a 30 °C por 48 h, após o que foram centrifugadas a 10.000 g por 15 min. Os sobrenadantes livres de células foram utilizados para avaliação da atividade emulsificante (E24) e medida da tensão superficial.

##### **4.2.4.1. Análise da atividade emulsificante (E24)**

A determinação da capacidade emulsificante foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Iqbal, Khalid e Malik (1995). O método consistiu em adicionar 2,0 mL de querosene à mesma quantidade de sobrenadante em um tubo de ensaio com tampa rosqueada, e agitar vigorosamente (*vortex*) por 2 minutos. Os tubos foram deixados em repouso por 24 h, a 25 °C, e o percentual de emulsificação (E24) foi calculado

dividindo-se a altura da camada emulsificada (mm) pela altura da camada total de líquido (mm), multiplicando-se por 100. Para facilitar a visualização das camadas, 200 µL de uma solução a 0,05% do corante Rosa Bengala foram acrescentados antes da agitação. Ao longo do experimento foram monitorados os parâmetros pH e salinidade, visto que estas variáveis podem interferir na formação das emulsões.

#### **4.2.4.2. Medida da Tensão Superficial**

As medidas de tensão superficial dos sobrenadantes foram realizadas em tensiômetro Krüss, modelo K6 utilizando o método de Du Nöuy (du NÖUY, 1925), 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, mantido a 30 °C. O equipamento foi previamente calibrado com água destilada na mesma temperatura e o Meio Mineral estéril foi utilizado como branco.

#### **4.2.4.3. Análise estatística dos dados**

Os dados obtidos com os experimentos de atividade emulsificante e tensão superficial foram submetidos à análise de agrupamento *K-means Cluster*, utilizando o programa Tanagra versão 1.4, disponível gratuitamente em <http://chirouble.univ-lyon2.fr/~ricco/tanagra/en/tanagra.html>.

### **4.2.5. Seleção de bactérias produtoras de biossurfactantes por métodos moleculares**

#### **4.2.5.1. Pesquisa do gene *sfp***

A amplificação do gene *sfp* tem sido sugerida como um método rápido e preciso para indicação de bactérias produtoras de surfactina (HSIEH et al., 2004). Para tanto, o DNA genômico dos isolados foi amplificado com os primers *sfp*-F (5'-ATGAAGATTTACGGAATTTA-3') e *sfp*-R (5'-TTATAA AAGCTCTTCGTACG-3') usando a seguinte programação da PCR: desnaturação a 94 °C por 30 segundos; 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 46 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 min, e 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1%, marcado com SYBR-Safe DNA em 0,5X TBE

(Invitrogen). A cepa *B. subtilis* LAMI008, reconhecidamente produtora de surfactina (BARRETO et al., 2010), foi utilizada como controle positivo.

#### 4.2.5.2. Pesquisa dos genes *ituD* e *lpa14*

Os genes *ituD* e *lpa14* (“*lipopeptide antibiotic production*” da cepa *B.subtilis* RB14) foram utilizados para pesquisa de linhagens produtoras de iturina que, embora seja primordialmente um antifúngico, já foi citado por alguns autores como biosurfactante, devido à semelhança estrutural com a surfactina (AHIMOU, JACQUES & DELEU, 2000; VATER et al., 2002; DAS & MUKHERJEE, 2007). Para esta análise, O DNA genômico foi amplificado com dois 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'), e *lpa*-14F (5'-ATG AAA ATT TAC GGA GTA TA-3') e *lpa*-14R (5'-TTA TAA CAG CTC TTC ATA CG-3'). A reação de amplificação obedeceu à seguinte sequência: desnaturação a 94 °C por 30 segundos; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 50 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1,5 min, e 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1%, marcado com SYBR™ *Safe DNA*. A cepa *B. subtilis* LAMI009 foi utilizada como controle positivo. Para a região amplificada o tamanho das bandas foi de 1203 pb para o gene *ituD* e 675 pb para *lpa14* (HSIEH et al., 2008).

#### 4.2.6. Ensaio de atividade antifúngica

A pesquisa de atividade antifúngica foi realizada para ratificar os resultados encontrados na prospecção dos genes para iturina. Para este teste, uma colônia bacteriana com 18 h de crescimento foi diluída em 5,0 mL de caldo nutritivo e 10,0 µl desta cultura foi inoculada em meio ANAS, formado por Agar Nutritivo e Agar Sabouraud na proporção 1:1 (m/m). Simultaneamente, foram semeados os inóculos da bactéria e do fungo, que consistiu de uma suspensão de esporos recuperados de um cultivo prévio de 72 h em Agar Sabouraud. Os fungos utilizados no experimento foram *Aspergillus niger*, *Penicillium herguei*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor* sp. e *Pythium oligandrum*. As placas

foram incubadas a 30 °C por sete dias, em câmara úmida. A cada dia, as culturas foram verificadas para analisar a velocidade de crescimento dos fungos em relação ao grupo controle, formado apenas por inóculo dos fungos em meio ANAS (SOUTO et al., 2004).

#### **4.2.7. Teste da dispersão do óleo com linhagens promissoras**

O teste da dispersão do óleo mede o diâmetro de superfícies limpas formadas quando uma alíquota de uma solução contendo biossurfactante entra em contato com sistema bifásico óleo-água. Antes da realização desse teste, foi necessário estabelecer, através de um experimento preliminar, qual volume de sobrenadante seria considerado ideal, de modo a permitir não apenas visualização dos halos, mas a comparação entre eles, mesmo que os biossurfactantes estivessem bastante diluídos nas amostras analisadas. Foram testados, individualmente, em um sistema formado por óleo e água, os volumes 10, 50, 100, 200 e 300 µL de sobrenadantes de três culturas com diferentes valores de tensão superficial final. Este critério foi adotado visto que, de acordo com Afshar e colaboradores (2008) os valores de tensão superficial estão inversamente relacionados ao tamanho dos halos de espalhamento de óleo. Dessa forma, linhagens cujos valores para tensão superficial foram baixos (menos que 50% do valor inicial), tendem a apresentar halos de espalhamento de óleo acima de 50% do tamanho da placa. Ao final deste ensaio, foi determinado que 200 µL seria o volume mínimo de sobrenadante que permitiria melhores comparações de tamanho de halo de espalhamento de óleo, de modo a facilitar a identificação das melhores linhagens para a produção de tensoativos.

Determinado o volume ideal, o ensaio de espalhamento de óleo foi realizado utilizando 0,5 g de petróleo que foi cuidadosamente derramado sobre 50 mL de água destilada em placas de Petri de 15 cm de diâmetro. Em seguida, 200 µl do sobrenadante de cada cultura testada, foram depositados sobre a superfície da interface óleo-água. Após a adição do sobrenadante, foi observado o comportamento de quebra da tensão interfacial seguida do espalhamento do óleo e formação de um halo central (YOUSSEF et al., 2004, com modificações). O resultado foi avaliado pela medida do halo de ruptura do óleo. Os ensaios foram feitos em duplicata.

## **4.2.8. Ensaio de simulação em biorremediação**

### **4.2.8.1. Limpeza de solo contaminado com petróleo**

Para este experimento utilizou-se um solo oriundo do manguezal da Baía de Todos os Santos, onde se encontra instalada, há 50 anos, a Refinaria Landulpho Alves – Mataripe (RLAM), que extrai diariamente 307 mil barris de petróleo, sendo a segunda maior refinaria do país. Segundo observações de campo realizadas por Veiga (2003), o manguezal da porção norte da Baía de Todos os Santos está completamente degradado, sendo atravessado por sistema de dutos, sofre a ação direta dos diversos derrames ocorrentes na região. Neste contexto, o solo encontra-se completamente impregnado com petróleo, devido ao acúmulo de frações pesadas de hidrocarbonetos. Esse material, portanto, foi escolhido para os ensaios de limpeza de solo utilizando biossurfactantes.

O ensaio consistiu em adicionar 150 ml de sobrenadante bruto, de uma das culturas com melhores resultados para produção de biossurfactantes, a 50 g de solo impregnado com petróleo e deixar esse sistema sob agitação de 150 rpm por 24 h. Como controle, uma porção equivalente do mesmo solo foi colocada em água do mar. Para avaliar o resultado, o sobrenadante e a água foram filtrados em *nylon* e o solo retido, seco em estufa a 60 °C por 24 h e pesado.

### **4.2.8.2. Remoção de óleo na superfície de água do mar**

A simulação de derrame foi realizada utilizando 2000 mL de água marinha a 30 °C e 10 g de petróleo depositado cuidadosamente sobre a água. Após estabilização da mancha, 50 mL do sobrenadante bruto de uma das culturas promissoras foi borrifado sobre o óleo a fim de avaliar a ruptura do filme. O ensaio também foi feito aplicando o sobrenadante no centro e nas extremidades da mancha, para avaliar a movimentação do óleo na superfície da água marinha.

#### 4.2.9. Extração e análise dos biossurfactantes parcialmente purificados

O tratamento dos sobrenadantes para pesquisa e extração de biossurfactantes foi feito conforme Yeh, Wei e Chang (2005), com modificações. Inicialmente os sobrenadantes livres de células foram acidificados a pH 2.0 e deixados *overnight* a 4 °C para precipitação de todo o biossurfactante. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, recuperado com 10 mL de água. A mistura bifásica foi alcalinizada a pH 8.0, permitindo a completa dissolução do precipitado. A solução obtida foi filtrada em membrana de 0,45 µm (Millipore, USA) após o que foi misturada por cinco minutos ao mesmo volume de acetato de etila. A mistura ficou em repouso por 1 h em um funil de separação, e as fases foram cuidadosamente separadas. O processo foi realizado três vezes para completa recuperação dos biossurfactantes. Posteriormente, o solvente foi evaporado e o sistema de biomoléculas analisado em HPLC. Os parâmetros cromatográficos encontram-se na Tabela 4. Além do acetato de etila, foram testados diclorometano e butanol como solventes de extração. A atividade do sistema de biomoléculas pré-purificado foi analisada sob dois aspectos. Inicialmente pela propriedade surfactante, através do ensaio de espalhamento do óleo. Além disso, foi feita também análise de atividade antifúngica, visto que alguns lipopeptídeos de *Bacillus* são bioativos contra fungos filamentosos.

**Tabela 4** - Condições operacionais do sistema HPLC (Waters).

<b>Parâmetros do sistema HPLC</b>	<b>Descrição / Valores</b>
Fase móvel	20% de ácido trifluoracético (3,8 mM) + 80% de acetonitrila
Vazão	1,0 mL / min
Volume de injeção	20 µL
Detector	UV
Absorbância	205 nm
<b>Parâmetros da Coluna</b>	<b>Descrição / Valores</b>
Nome (coluna de fase reversa)	Column Symetric C18 – Waters
Espessura	5µm

#### 4.2.10. Estudo da formação de micelas por condutividade

Para este ensaio foram preparadas diluições seriadas do biossurfactante produzido por Jag248. Em seguida, triplicatas de cada diluição foram inicialmente termostatizadas a 25 °C e então submetidas à leitura de condutividade (Condutímetro Melter-Toledo, São Paulo, Brasil). Os valores de condutividade foram plotados contra as diluições do tensoativo para a determinação do ponto de interseção das duas retas, que correspondente a passagem do estado de monômero para o de micela. Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) foi utilizado para calibrar o condutímetro e como surfactante controle (MORAES & REZENDE, 2004).

#### 4.2.11. Identificação molecular e análise filogenética das linhagens promissoras

Para extração do DNA, os isolados selecionados foram crescidos em 5,0 mL de Caldo Nutritivo por 18 h a 30 °C sob agitação de 150 rpm, distribuídos em tubos de 1,5 mL e centrifugados por 5 minutos a 12.000 g (Mini Spin – Eppendorf, USA). Os sedimentos foram lavados com 1,0 mL de água destilada estéril e novamente centrifugados por 5 minutos a 12000 g. Foram adicionados 750 µL de solução CTAB 2X (Tris-HCl 100 mM; EDTA 20 mM; NaCl 14M) pré aquecido a 60 °C contendo β-mercaptoetanol 0,2% v/v e os tubos incubados em banho-maria a 60 °C por 4 h. Após esse período foram adicionados 750 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e os tubos novamente centrifugados por 30 minutos a 12000 g. A fase aquosa foi transferida para um microtubo Eppendorf, onde foi acrescido 400 µL de isopropanol 100%. A mistura foi centrifugada por 5 minutos a 12000 g, o sobrenadante, descartado e o sedimento, lavado com 300 µL de etanol 70%, sendo novamente centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o sedimento (DNA) foi ressuscitado em 75 µL de TE-RNase (Tris- EDTA 10 mM; NaCl 10 mM, pH 8,0; RNase a 20 µL/mL). O DNA extraído foi analisado pela medida da absorbância a 260 nm (NANODROP, ND 1000, USA).

A identificação molecular foi realizada baseada no gene do RNA ribossomal (rRNA) 16S, amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3') e 1525R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'). As reações de PCR foram feitas usando 100 ng de DNA, 5 µM de cada um dos iniciadores, 10 mM de cada um dos dNTP's (Invitrogen), 5U de Taq

DNA polimerase (Invitrogen), tampão de PCR 10X (Invitrogen), 20 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), em um volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada em termociclador (Master-cycler<sup>TM</sup> MJ Research) com o seguinte programa: desnaturação a 94 °C durante 2 minutos, desnaturação a 94 °C durante 1 minuto, anelamento a 51 °C durante 2 minutos, extensão a 72 °C durante 2 minutos (25 ciclos) e, para finalizar, 10 minutos de incubação à temperatura de 72 °C. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1% corado com Sybr® Green (Invitrogen), sob luz ultravioleta. Os produtos foram purificados usando kit comercial (Invitrogen) e enviados para sequenciamento no Macrogen (Korea). As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências depositadas no *GenBank* do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) e no RDP (*Ribosomal Database Project*) para análise de similaridade. Para classificação dos isolados foi utilizado o programa *Classifier* do RDP e a árvore filogenética foi construída por *Neighbor-joining* usando o programa CodonCode Aligner versão 3.7.1 (CodonCode Corporation).

# Resultados

---



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização físico-química dos solos

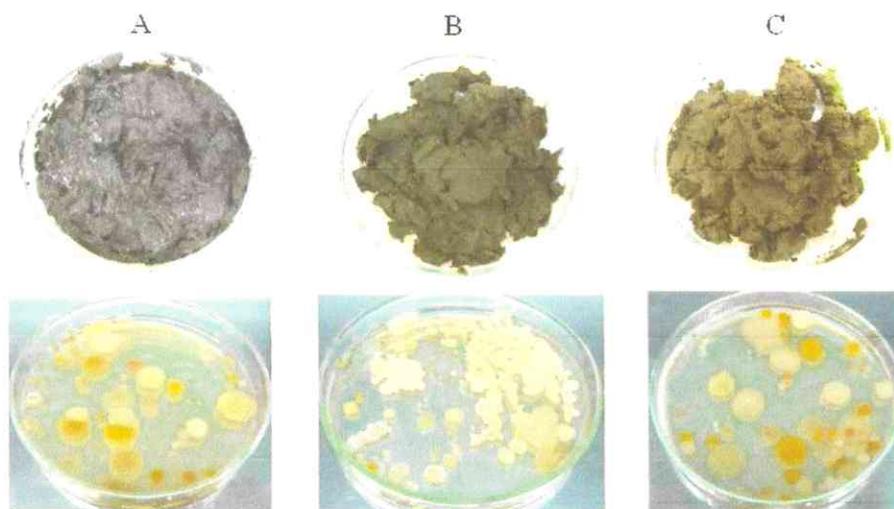
Os resultados das análises físico-químicas das amostras de solos revelaram diferenças entre os pontos de coleta, sendo os pontos relativos às áreas florestadas P2 e P3 os mais ricos em silte-argila e matéria orgânica, e de maiores salinidades (Tabela 5).

**Tabela 5** – Análise dos parâmetros físico-químicos dos solos do manguezal do Rio Jaguaribe em novembro de 2008 (período seco).

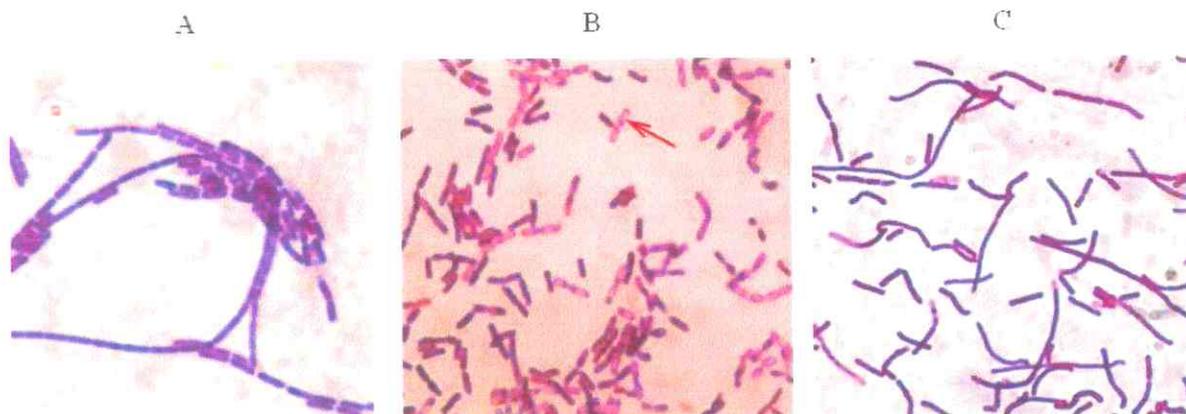
<b>Parâmetros</b>	<b>Ponto</b>	<b>Valores</b>
<b>pH</b>	P1	7,5 ± 0,21
	P2	7,3 ± 0,08
	P3	7,3 ± 0,16
<b>Temperatura (°C)</b>	P1	33 ± 1,24
	P2	29 ± 1,24
	P3	30 ± 1,70
<b>Salinidade</b>	P1	35 ± 0,47
	P2	45 ± 0,94
	P3	45 ± 0,81
<b>Silte + Argila (%)</b>	P1	20,8 ± 2,01
	P2	62,3 ± 2,70
	P3	67,5 ± 4,62
<b>Matéria Orgânica (%)</b>	P1	3,0 ± 0,20
	P2	9,3 ± 0,25
	P3	7,6 ± 0,33

## 5.2. Isolamento de linhagens produtoras de esporos do solo do manguezal

Após o aquecimento das amostras de solo a 80°C por 1h, foram recuperados 150 isolados, sendo que para esse estudo foram avaliados 100 isolados. Destes microorganismos, 35 foram provenientes das amostras do ponto P1 (proximidades do Rio Jaguaribe), 35 do ponto P2 (área colonizada pela espécie *R. mangle*) e 30 de P3 (área povoada por *A. schaueriana*) (Figura 6). A maioria dos isolados apresentou características morfológicas típicas de bactérias do gênero *Bacillus*, ou seja, bastonetes Gram-positivos, produtores de esporo (Figura 7). Após o isolamento, as bactérias foram armazenadas a -80 °C em caldo nutritivo com glicerol a 15%. Para identificar a origem de cada uma das linhagens, optou-se por enumerar, após a abreviação Jag, referente a Jaguaribe, o número de cada um dos pontos. Dessa forma, linhagens que foram enumeradas com Jag seguida de números começando em 1, pertenceriam ao ponto P1. A mesma nomenclatura foi adotada para os pontos P2 e P3.



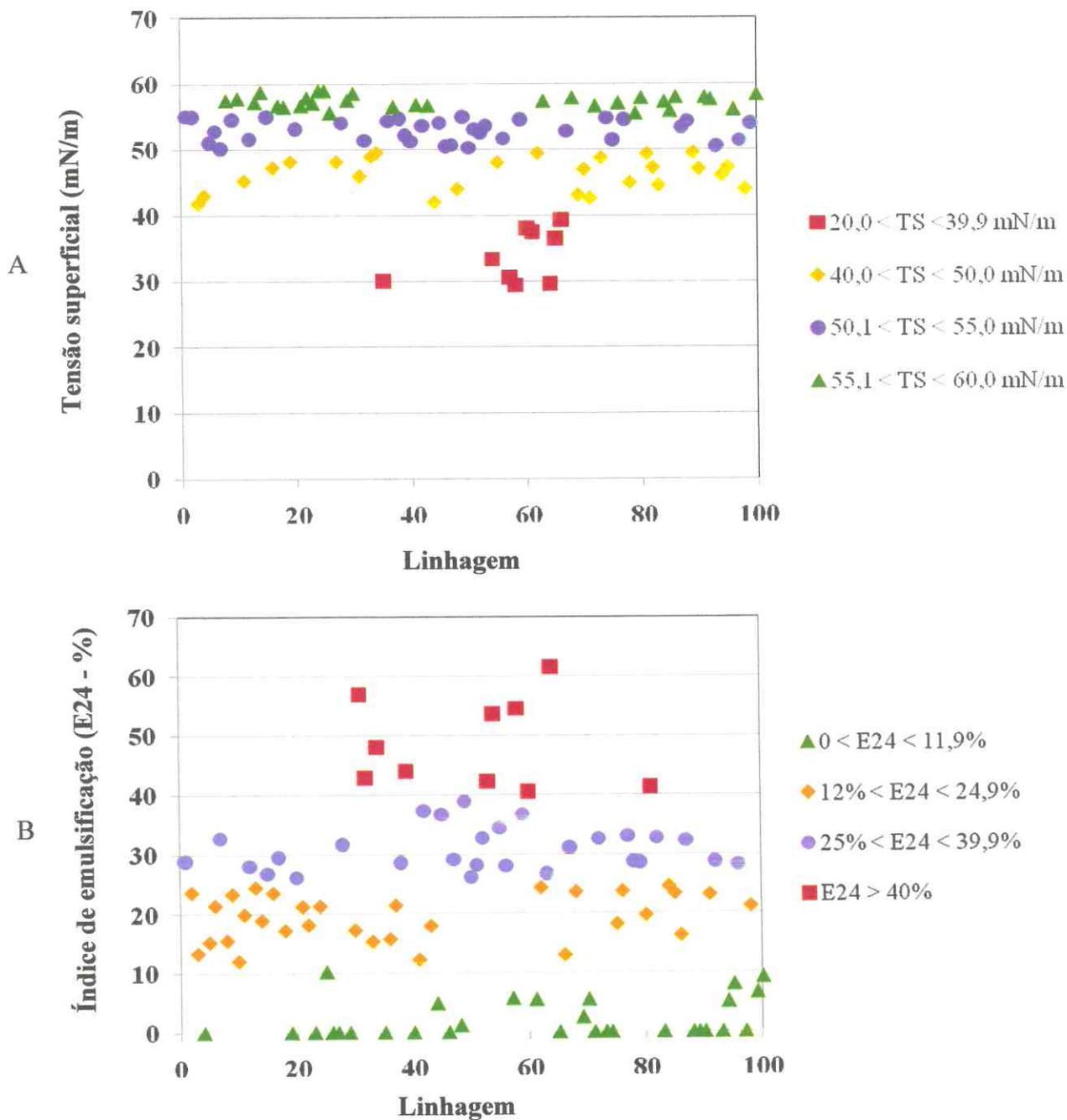
**Figura 6** - Aspecto das amostras de solo coletadas (A) à beira do Rio Jaguaribe (P1), (B) na rizosfera de *R. mangle* (P2) e (C) na rizosfera de *A. schaueriana* (P3) e seus respectivos isolados obtidos após o choque térmico.



**Figura 7** - Características morfológicas de isolados do Rio Jaguaribe, cujos aspectos referem-se ao grupo *Bacillus*. (A) Jag1732; (B) Jag248; (C) Jag310. Seta indicando célula com esporo. Lâminas coradas pelo método de Gram e fotografadas em microscópio óptico com aumento de 1000 x.

### 5.3. Seleção de linhagens produtoras de biossurfactantes

Para a seleção de linhagens produtoras de biossurfactantes, dois parâmetros foram analisados. O primeiro deles, diz respeito à redução de tensão superficial e o segundo, à formação de emulsões estáveis. O critério adotado para selecionar um micro-organismo como bom produtor de tensoativos foi apresentar valor de tensão superficial final abaixo de 40 mN/m (COOPER, 1986); enquanto que como bom produtor de emulsificante foi considerado todo aquele cujo valor de emulsificação foi maior ou igual a 40% (YOUSSEF et al., 2004). Baseado nestes limites, através da análise de *cluster* de todos os dados obtidos, foram formados quatro agrupamentos para cada um dos ensaios realizados. Dessa forma, foram selecionadas nove linhagens produtoras de biossurfactantes e dez de emulsificantes (Figuras 8, 9 e 10). Os resultados de todos os isolados encontram-se nos anexos A e B.



**Figura 8** – Análise de agrupamento dos valores obtidos nos ensaios de (A) tensão superficial e (B) índice de emulsificação. Quadrados vermelhos em ambos os gráficos indicam os melhores resultados.

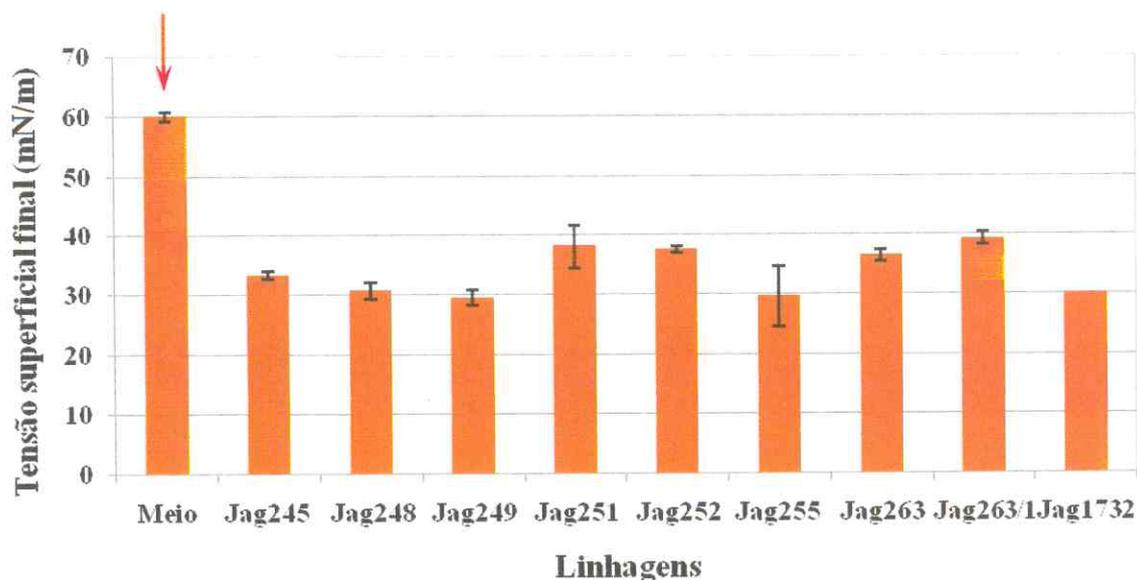


Figura 9 – Medida da tensão superficial final após o crescimento das culturas em Meio Mineral por 48 h. Seta indicando valor da tensão superficial inicial, antes do crescimento microbiano.

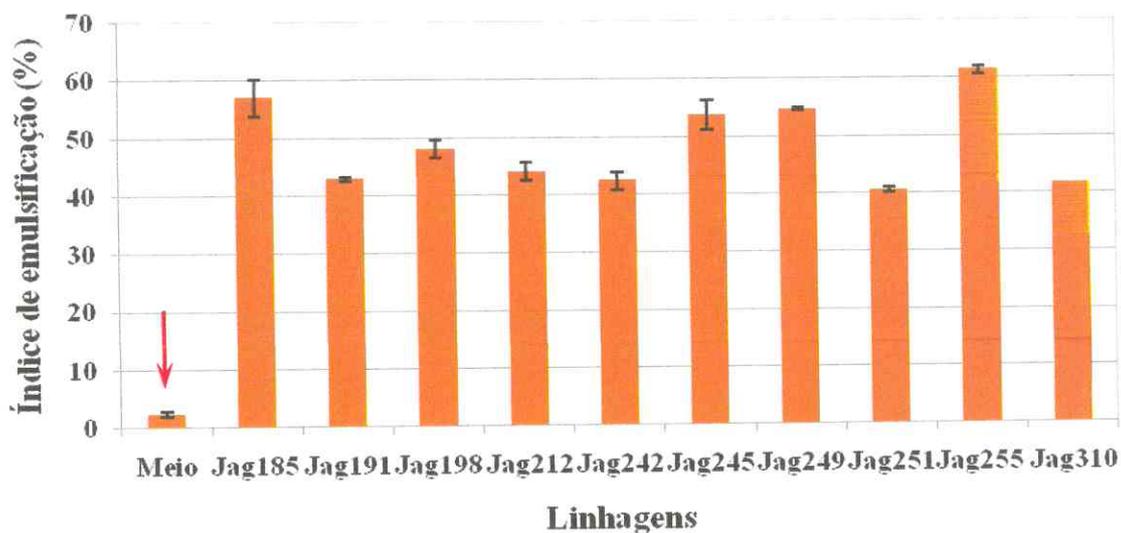
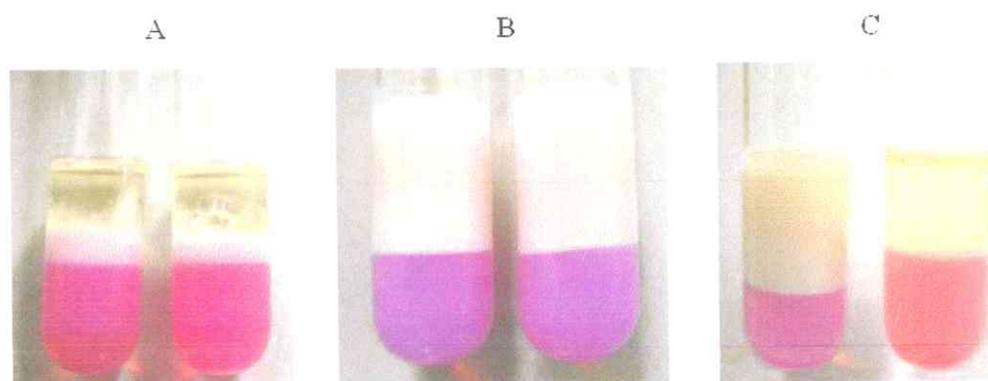


Figura 10 – Medida do índice de emulsificação do querosene com sobrenadante das culturas, após o crescimento em Meio Mineral por 48 h. Seta indicando o valor de emulsificação do meio esterilizado.

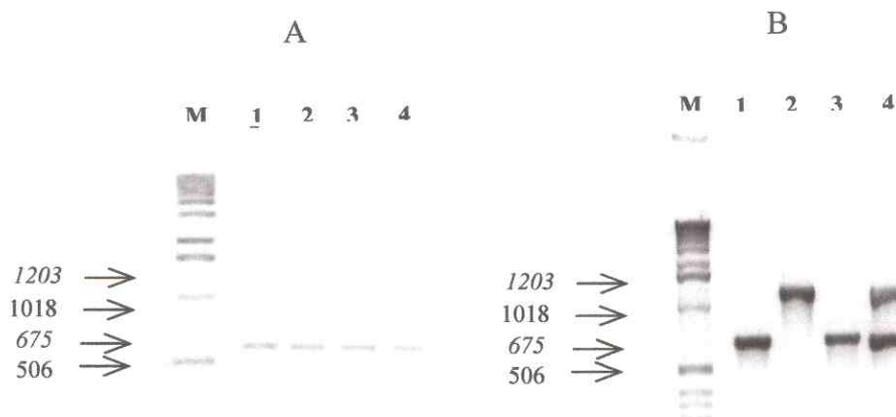
O sobrenadante da linhagem Jag248 chamou atenção por formar uma camada de emulsão de 100% no ensaio de E24 que, no entanto, se desfez rápida e completamente, após 24 h de repouso da mistura. Observado este fenômeno, decidiu-se avaliar o potencial emulsificante dos produtos desse micro-organismo, adicionando-se 300  $\mu$ L do sobrenadante bruto da cultura em uma emulsão estável formada por Meio Mineral, querosene e Tween 80, um surfactante comercial utilizado como controle positivo para o ensaio de emulsificação. Através deste teste, foi possível perceber nitidamente, ao longo de 30 dias, a quebra completa da emulsão formada por Tween 80, sugerindo que a linhagem Jag248 produziu um desemulsificante (Figura 11).



**Figura 11** - (A) Atividade emulsificante formada com o sobrenadante da cultura Jag248. (B) Controle do ensaio, formado pela mistura de Meio Mineral, querosene e Tween 80, evidenciando a camada emulsificada. (C) Emulsão após 30 dias: tubo à esquerda, controle sem adição do sobrenadante e, tudo à direita, acrescido do sobrenadante.

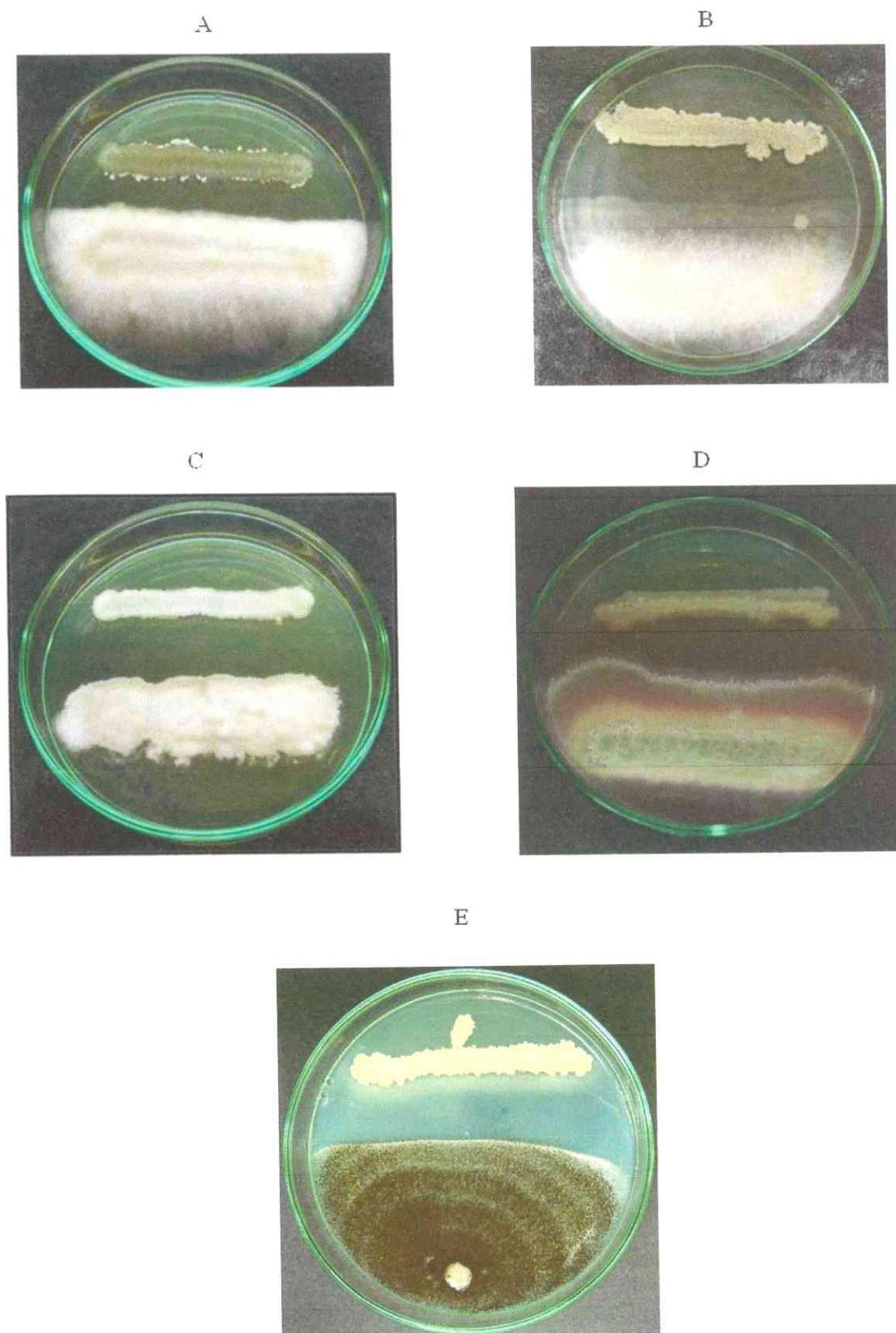
#### 5.4. Pesquisa dos genes *sfp*, *ituD* e *lpa14*

O gene *sfp*, ligado à produção de surfactina, foi detectado apenas nas linhagens Jag15B, Jag185 e Jag249. Em relação aos genes para iturina *ituD* e *lpa14*, foram positivas as linhagens Jag227, Jag230, Jag248 e Jag255 (Figura 12).

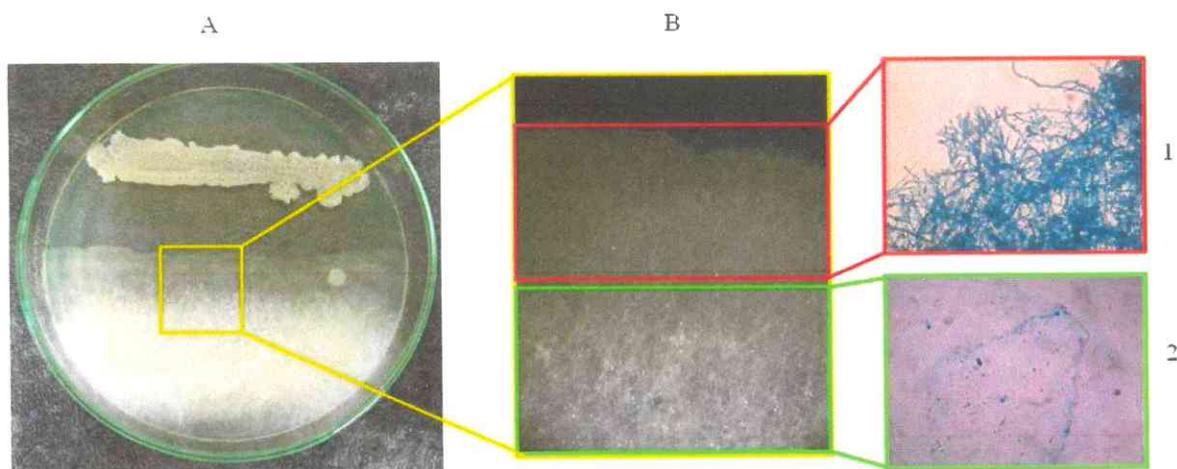


**Figura 12** – (A) Pesquisa do gene *sfp*. M - marcador; (1) Jag15B; (2) Jag185, (3) Jag249 e (4) *B.subtilis* LAMI008. (B) Pesquisa dos genes *ituD* e *lpa14*. M - marcador; (1) *B. subtilis* LAMI009 para o gene *lpa14*; (2) Jag248 para o gene *ituD*; (3) Jag248 para o gene *lpa14*; (4) Jag255 para *ituD* e *lpa14*. Tamanho dos fragmentos: *lpa14* - 675 pb; *ituD* - 1203 pb.

A pesquisa da expressão dos genes *ituD* e *lpa14*, cujos produtos estão envolvidos na atividade antifúngica, foi feita através da pesquisa dessa atividade contra os fungos filamentosos *Aspergillus niger*, *Penicillium herguei*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor* sp. e *Pythium oligandrum*. Em ensaio de antibiose em placa, a colônia de Jag248 inibiu o crescimento de todos os fungos testados (Figura 13). Um exemplo dessa atividade, contra *Mucor* sp., pode ser visualizada com detalhes na Figura 14. Neste caso percebe-se nitidamente a inibição não apenas das hifas vegetativas, mas em especial, das hifas aéreas, responsáveis pela produção de esporos.



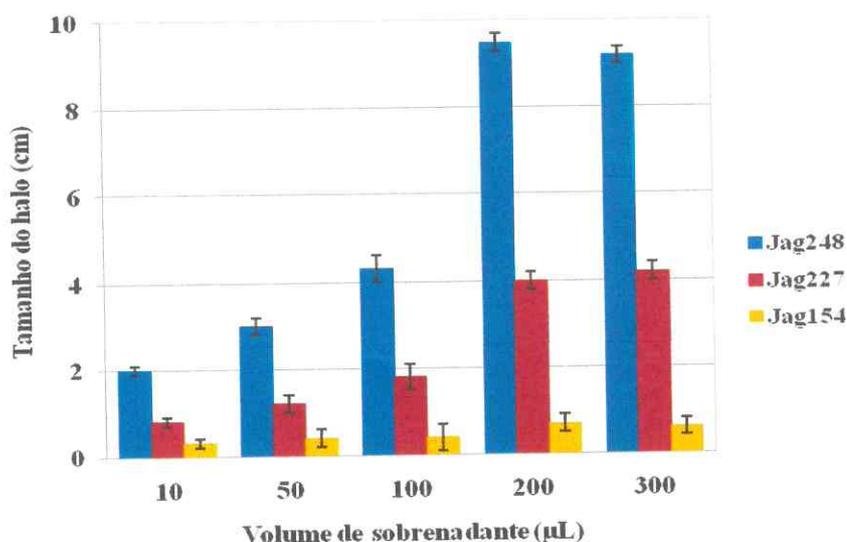
**Figura 13** - Atividade da linhagem Jag248 contra os fungos (A) *Fusarium oxysporum*; (B) *Mucor* sp.; (C) *Pythium oligandrum*; (D) *Penicillium herguei* e (E) *Aspergillus niger*.



**Figura 14** - (A) Inibição de *Mucor* sp. por Jag248. (B) Detalhe evidenciando (1) a presença exclusiva de hifas vegetativas na porção mais próxima ao crescimento bacteriano e (2) hifas reprodutivas (aéreas) apenas na porção mais distante. Lâminas coradas com azul algodão de lacto-fenol e fotografadas em microscópio óptico com aumento de 400 x.

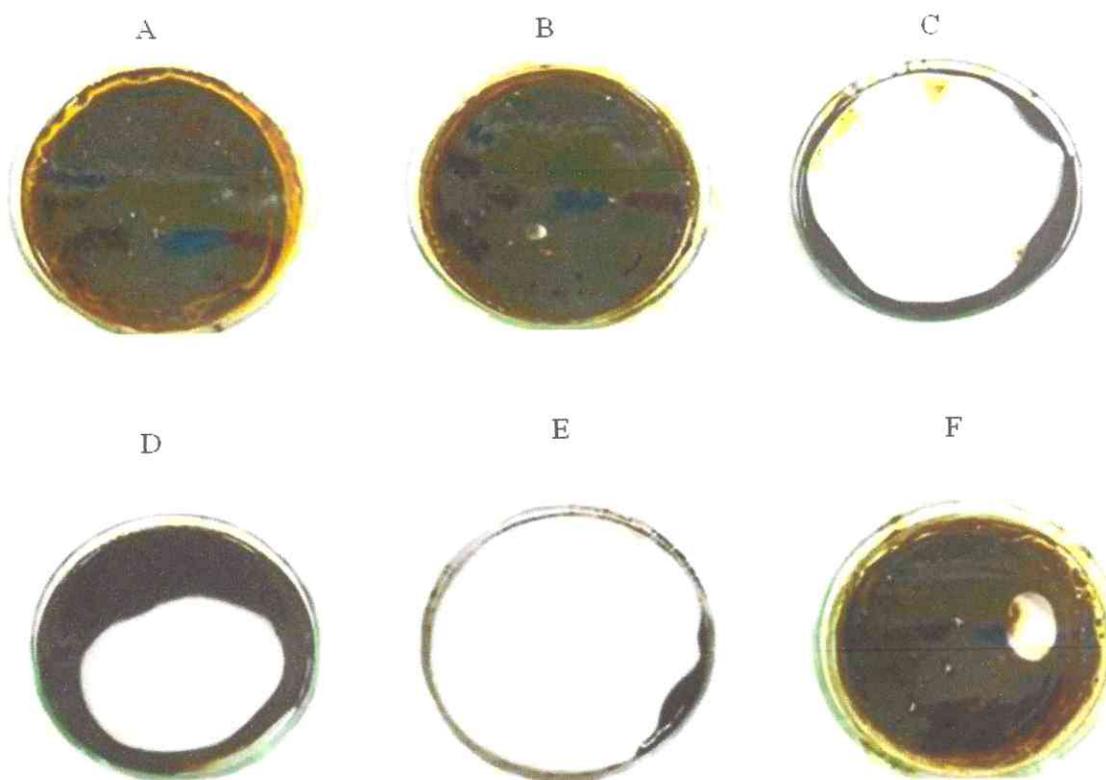
### 5.5. Ensaio de dispersão do óleo

O ensaio preliminar para determinação do volume ideal de sobrenadante a ser adicionado no teste de dispersão de óleo mostrou que 200  $\mu\text{L}$  seria o mínimo ideal para permitir comparações de tamanho de halo, independentemente da concentração do biossurfactante nas amostras analisadas (Figura 15).



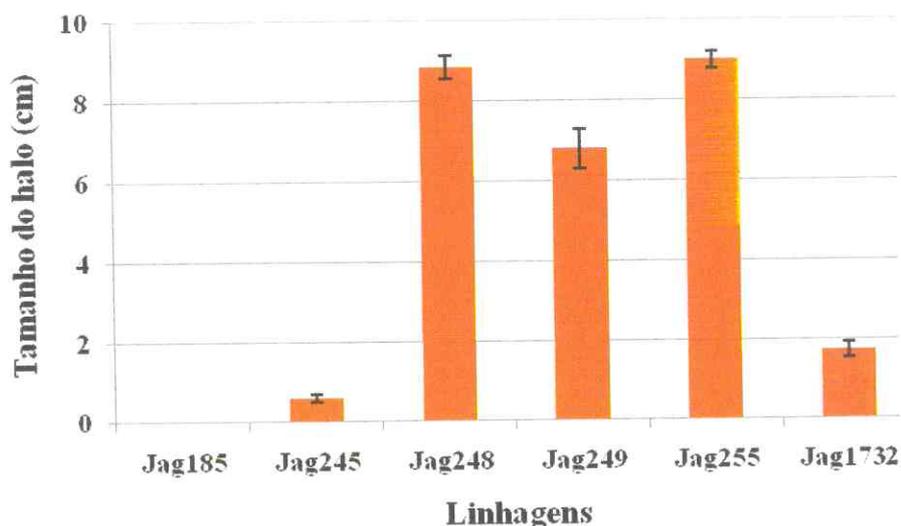
**Figura 15** – Relação entre o tamanho dos halos de dispersão de óleo e o volume de sobrenadante adicionado ao sistema óleo-água.

O ensaio de dispersão de óleo foi realizado com as linhagens selecionadas nos experimentos de emulsificação e de redução da tensão superficial. Jag248, Jag249 e Jag255 foram as únicas bactérias que produziram resultados positivos, com halos superiores a 50% do diâmetro da placa (Figura 16).



**Figura 16** – Comportamento de dispersão do óleo após adição dos sobrenadantes brutos das bactérias isoladas do manguezal (A) Jag185; (B) Jag245; (C) Jag248; (D) Jag249; (E) Jag255 e (F) Jag1732.

Os halos formados após a aplicação dos 200  $\mu$ l do sobrenadante das culturas foram medidos nas duplicatas, e os resultados podem ser vistos na Figura 17.



**Figura 17** – Diâmetro (cm) das zonas limpas formadas na superfície do filme de petróleo, com o sobrenadante da cultura dos seis isolados selecionados.

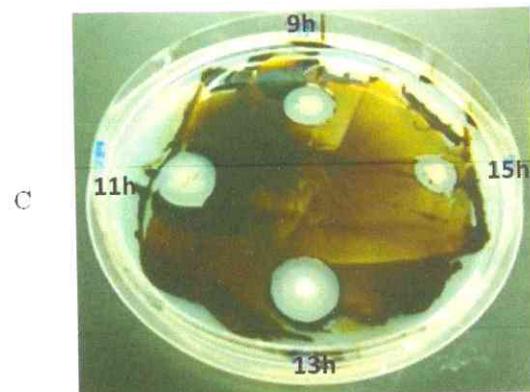
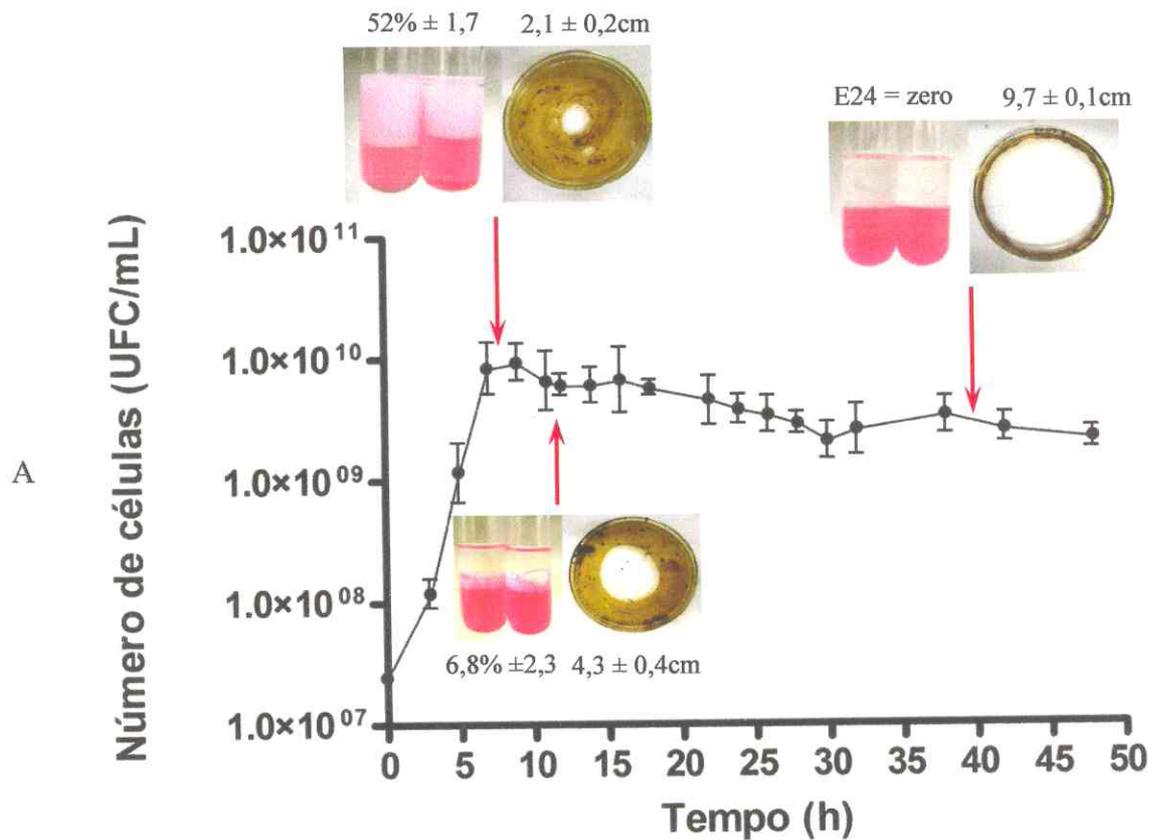
Devido ao fato da linhagem Jag248 ter mostrado resultados promissores tanto para produção de um desemulsificante, pelo ensaio de E24, como de biossurfactante, pela dispersão do óleo e redução da tensão superficial do meio, este micro-organismo foi selecionado para os testes de biorremediação. Estes experimentos envolveram a limpeza de uma amostra de solo da Baía de Todos os Santos e a remoção de uma mancha de óleo em uma simulação de derrame de petróleo em água marinha.

Além desses ensaios, foram realizados os experimentos de curva de crescimento para detectar em que momento Jag248 começava a produção do surfactante; análises do sobrenadante frente a variações de pH e temperatura a fim de entender como esses parâmetros influenciavam nas atividades estudadas e purificação do biossurfactante produzido por esta linhagem, conforme descrito no item 4.2.9.

### **5.6. Construção da curva de crescimento e ensaios de caracterização do biossurfactante**

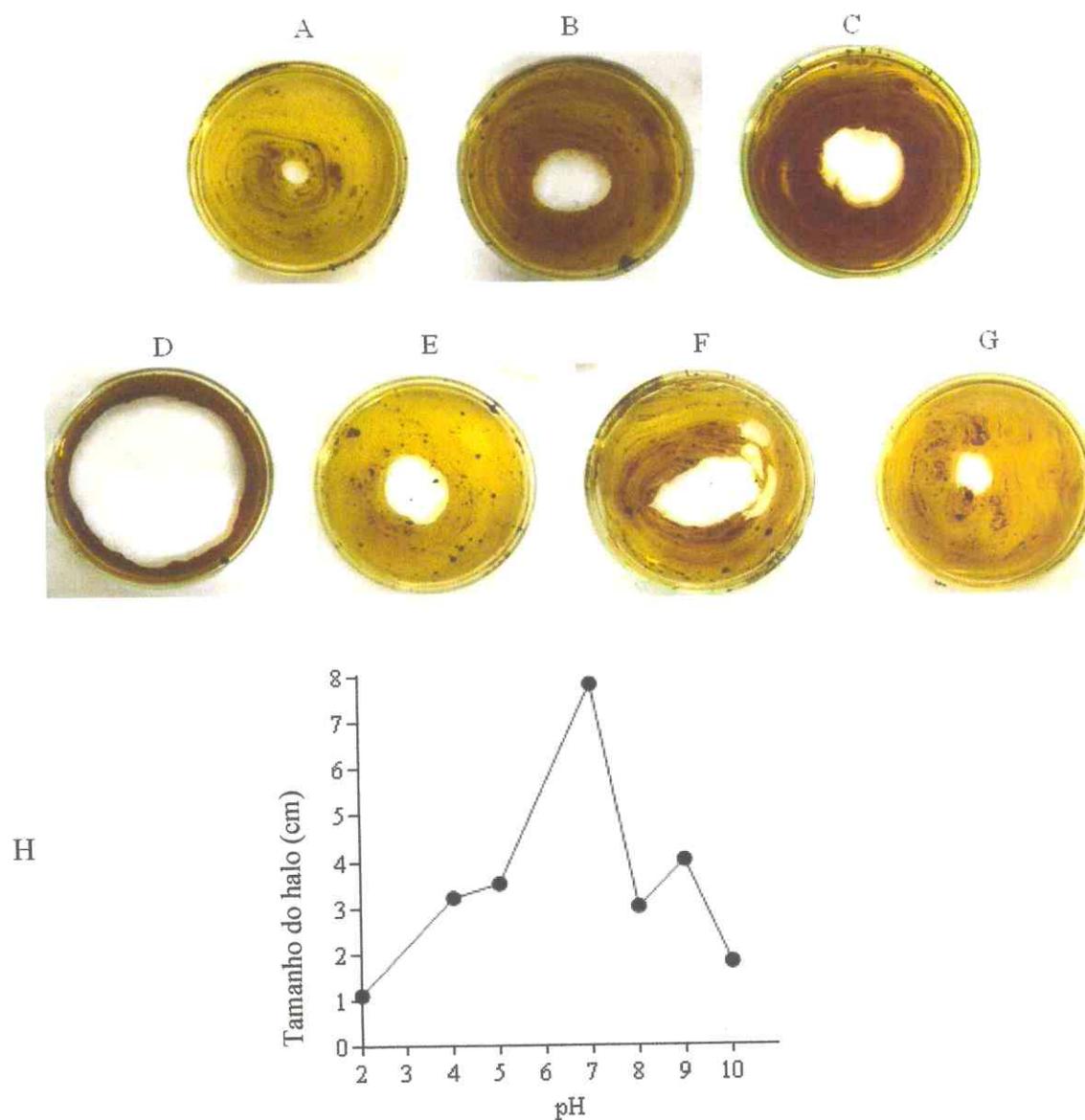
A curva de crescimento foi construída baseada na contagem de células viáveis a cada duas horas durante 48 h, bem como a análise do sobrenadante da cultura em cada um dos tempos para verificar a produção de biossurfactantes e do desemulsificante por Jag248,

através de ensaios de emulsificação e de espalhamento do óleo. O cultivo foi realizado conforme descrito no item 4.2.4. A Figura 18 mostra que a cultura começou a produzir emulsificante após 7 h de incubação, mas que essa produção foi momentânea, cessando com 11 h de crescimento. Após este período, todas as emulsões foram bastante instáveis, sugerindo a produção do desemulsificante. Em relação ao comportamento tensoativo, observado nos experimentos de espalhamento de óleo, o melhor resultado foi obtido após 40 h de incubação de Jag248.



**Figura 18** – (A) Curva de crescimento do isolado Jag248 em Meio Mineral, incubada por 48 h a 30°C sob agitação de 150 rpm. Em destaque, os pontos 7h, 11h e 40h, mostrando a dinâmica da produção do biosurfactante e do desemulsificante. Valores acima das figuras indicam as medidas de emulsificação (E24 - %) e de tamanho de halo de dispersão de óleo (em cm). Todos com os respectivos desvios. (B) Aspecto da cultura com 7 h de crescimento, mostrando espuma abundante. (C) Subcultivo de Jag248 em Agar Nutritivo contendo petróleo na superfície, em diferentes tempos de incubação. Halos de afastamento do óleo ao redor das colônias sugerem a produção de tensoativos pela cultura.

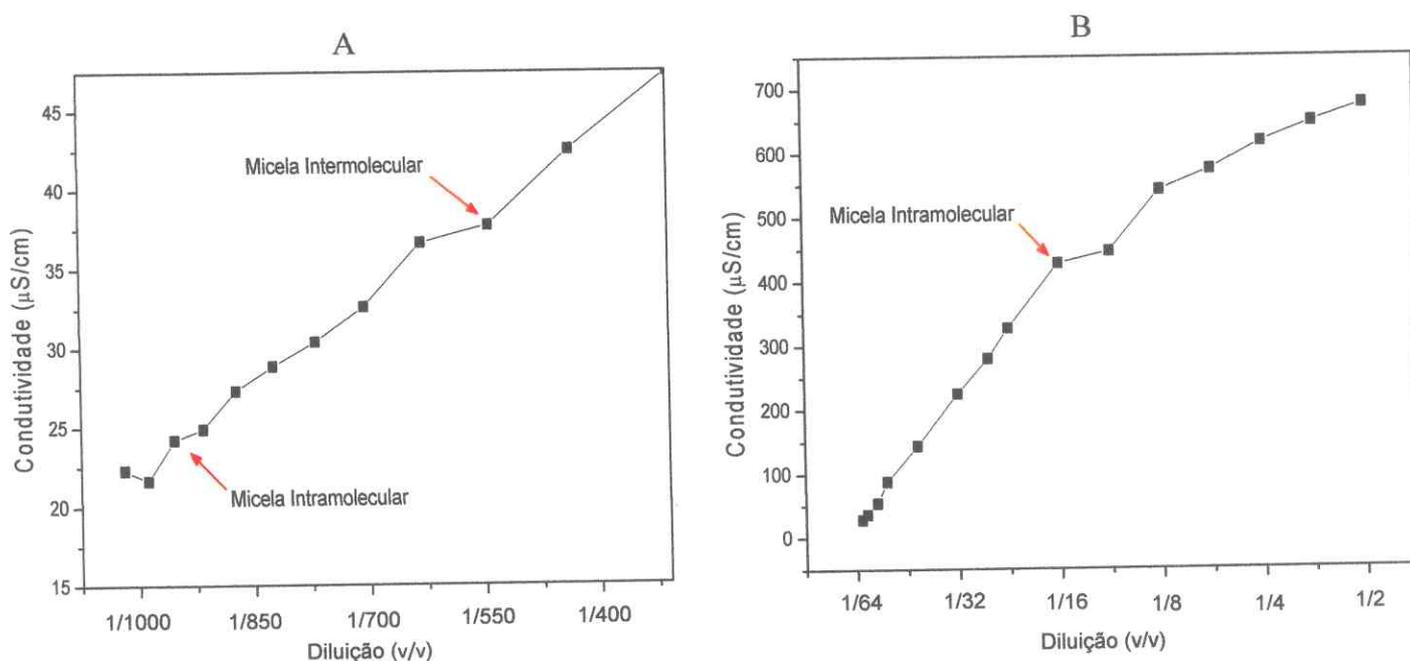
Os ensaios para verificação do efeito do pH revelaram que o biossurfactante produzido por Jag248 atua melhor em pH 7.0 (Figura 19). Em relação ao ensaio de variação de temperatura, a atividade tensoativa permaneceu estável mesmo após o sobrenadante ter sido aquecido a 121 °C por 1 hora.



**Figura 19** – Aspecto do espalhamento do óleo em diferentes valores de pH. (A) pH 2.0; (B) pH 4.0; (C) pH 5.0; (D) pH 7.0; (E) pH 8.0; (F) pH 9.0; (G) pH 10.0. (H) Comparação entre os tamanhos dos halos de espalhamento de óleo (cm) de acordo com as mudanças de pH.

### 5.6.1. Estudo da formação de micelas por condutividade

Segundo a análise de condutividade, o sistema de biomoléculas de Jag248 apresenta duas formas de interações micelares. Na diluição 1/950 ocorre a conversão dos monômeros, formando a micelas intramoleculares. Da interação dessas micelas, na diluição 1/550, observa-se o surgimento das micelas intermoleculares. Para o SDS, surfactante padrão para esta metodologia, observa-se a formação apenas das micelas intramoleculares, na diluição 1/16 (Figura 20).



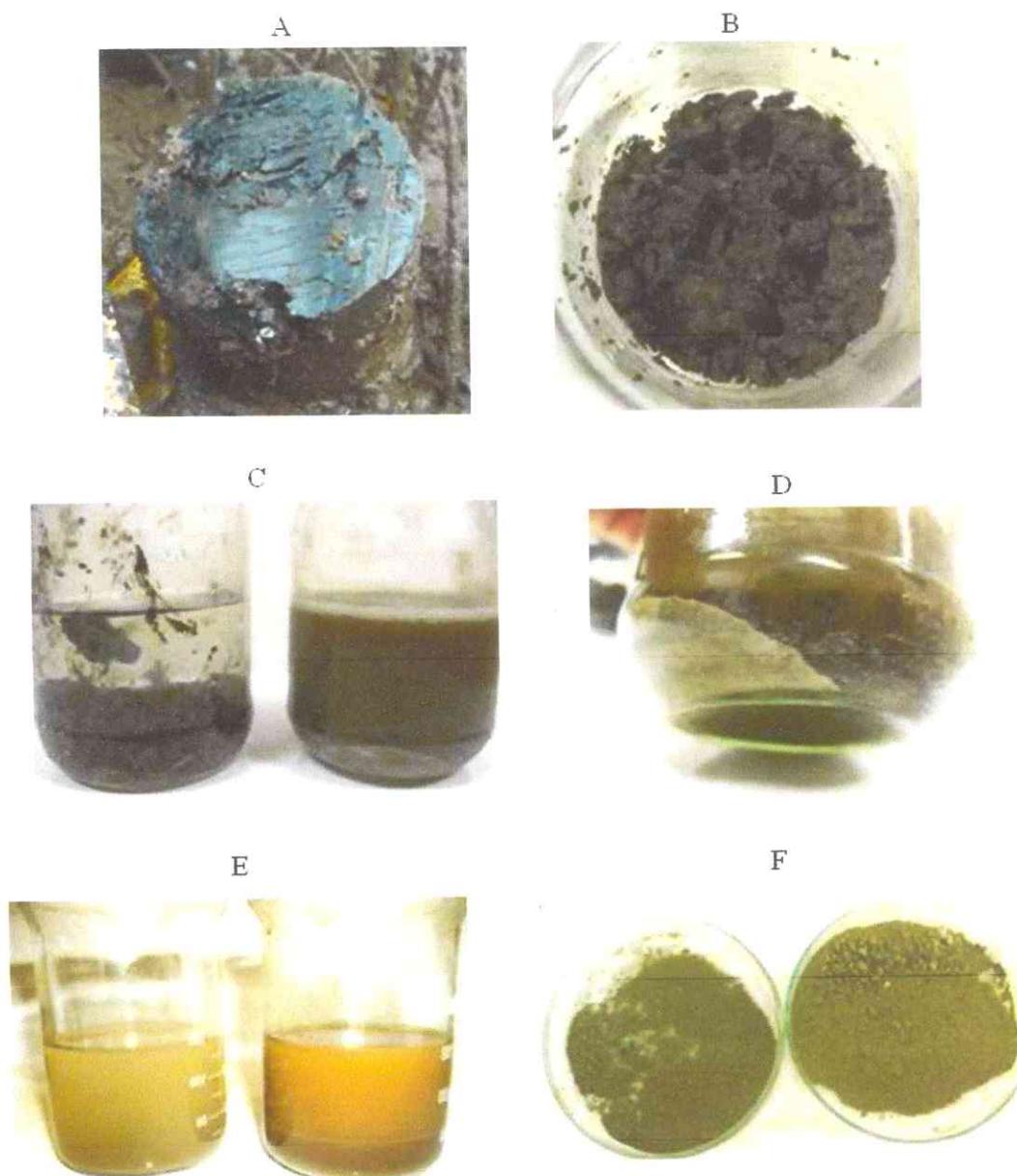
**Figura 20** – Relação entre condutividade e diluições na formação de micelas (A) do biosurfactante de *Bacillus sp.* Jag248 e (B) do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS).

## 5.7. Testes de simulação em biorremediação com amostras reais

### 5.7.1. Limpeza de solo contaminado com petróleo

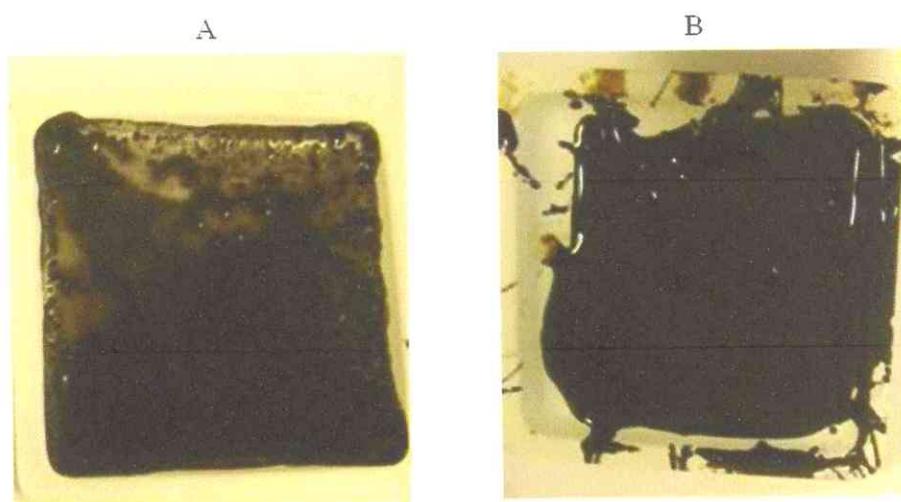
Nos ensaios de limpeza do solo do manguezal da Baía de Todos os Santos, contaminado com petróleo (Figura 21 A e 21 B), foi possível observar o desligamento do óleo imediatamente após a imersão do solo no sobrenadante bruto da cultura Jag248 (Figura 21 C e 21 D). Após 24 h de agitação, foi possível realizar a recuperação de 6,8 g de

solo do grupo experimental contra 2,1 g do grupo controle, no qual o solo estava imerso apenas em água do mar (Figura 21 E e 21 F).



**Figura 21** – (A) Aspecto do solo no manguezal da Baía de Todos os Santos, mostrando o petróleo impregnado ao longo dos anos. (B) Amostra utilizada nos ensaios de limpeza de solo. (C) Preparo das amostras. Lado esquerdo – solo com água marinha (controle negativo); lado direito – solo imerso no sobrenadante de Jag248. (D) Detalhe do solo desligado do petróleo imediatamente após a imersão no sobrenadante da cultura. (E) Solo recuperado após 12 h de agitação. Amostra esquerda, controle e amostra direita, experimental, mostrando o solo acumulado no fundo da vidraria. (F) Aspecto dos solos recuperados, após a secagem. Placa esquerda, controle e direita, experimental.

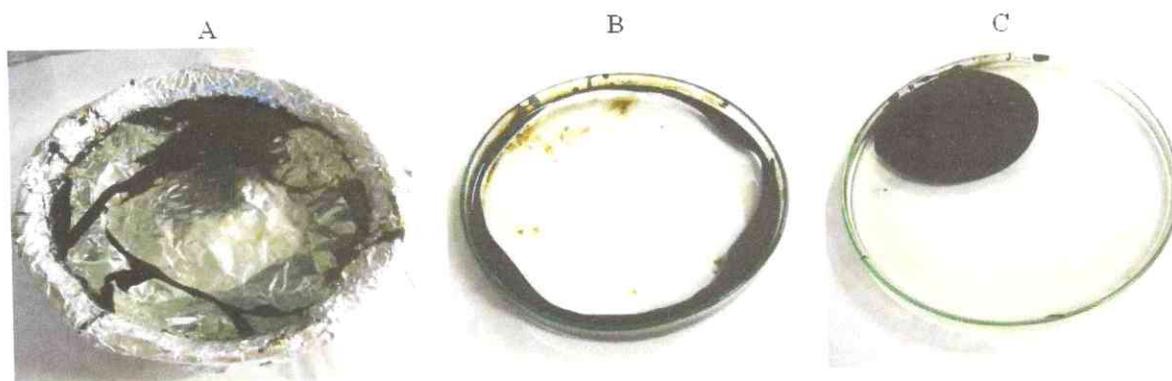
Este resultado nos despertou para a possibilidade do produto microbiano produzido por *Bacillus* sp. Jag248 ser utilizado em procedimentos de MEOR (recuperação melhorada do petróleo por ação microbiana). Desta forma, fizemos ensaios de agitação vigorosa em *vortex*, por 2 minutos, de 5,0 mL de petróleo juntamente com o mesmo volume de sobrenadante. Após a agitação, o petróleo apresentou-se fluido, conforme pode ser visualizado na Figura 22.



**Figura 22** – (A) Aspecto do petróleo após agitação com sobrenadante de Jag248. (B) Controle, agitado com água marinha.

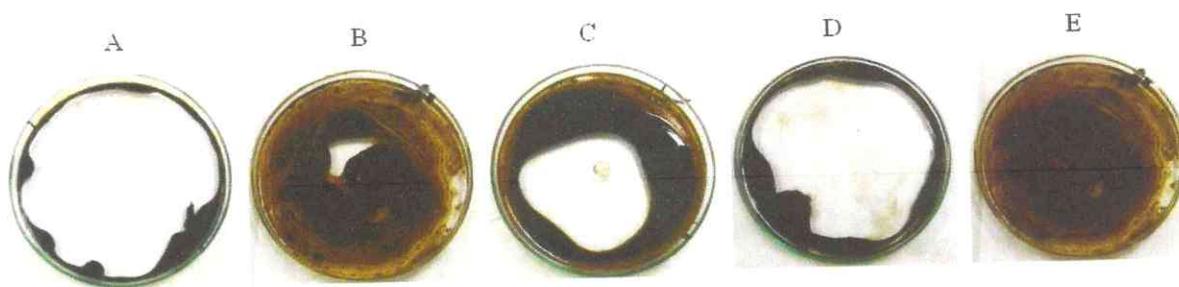
### 5.7.2. Remoção de petróleo da água do mar

A aplicação do sobrenadante não purificado de Jag248 na superfície do petróleo causou o rompimento aleatório da mancha na superfície da água (Figura 23 A). No caso da aplicação do sobrenadante no centro da mancha, esta se desfez de forma simétrica, colapsando no centro e aumentando o diâmetro de forma contínua no decorrer do tempo (Figura 23 B). A aplicação do sobrenadante nas extremidades da mancha fez com que o petróleo ficasse contido em um só ponto, facilitando posterior remoção (Figura 23 C).



**Figura 23** – Comportamento de ruptura da mancha de petróleo na superfície da água do mar após adição do sobrenadante não purificado de Jag248. (A) Sobrenadante borrifado sobre a mancha. (B) Sobrenadante gotejado no centro da mancha. (C) Sobrenadante adicionado nas extremidades da mancha.

Para fins comparativos, o ensaio de limpeza de água marinha também foi realizado utilizando surfactantes comerciais. Neste experimento foram utilizados 50 mL de água, 0,5 g de petróleo e 0,5 mL do surfactante teste. Foram analisados dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% v/v, Tween 80 e quaternário de amônio (QUAT) puro. Água destilada foi utilizada com controle negativo. O QUAT foi o único surfactante que causou ruptura total da camada de petróleo, semelhante ao biosurfactante de Jag248 (Figura 24).

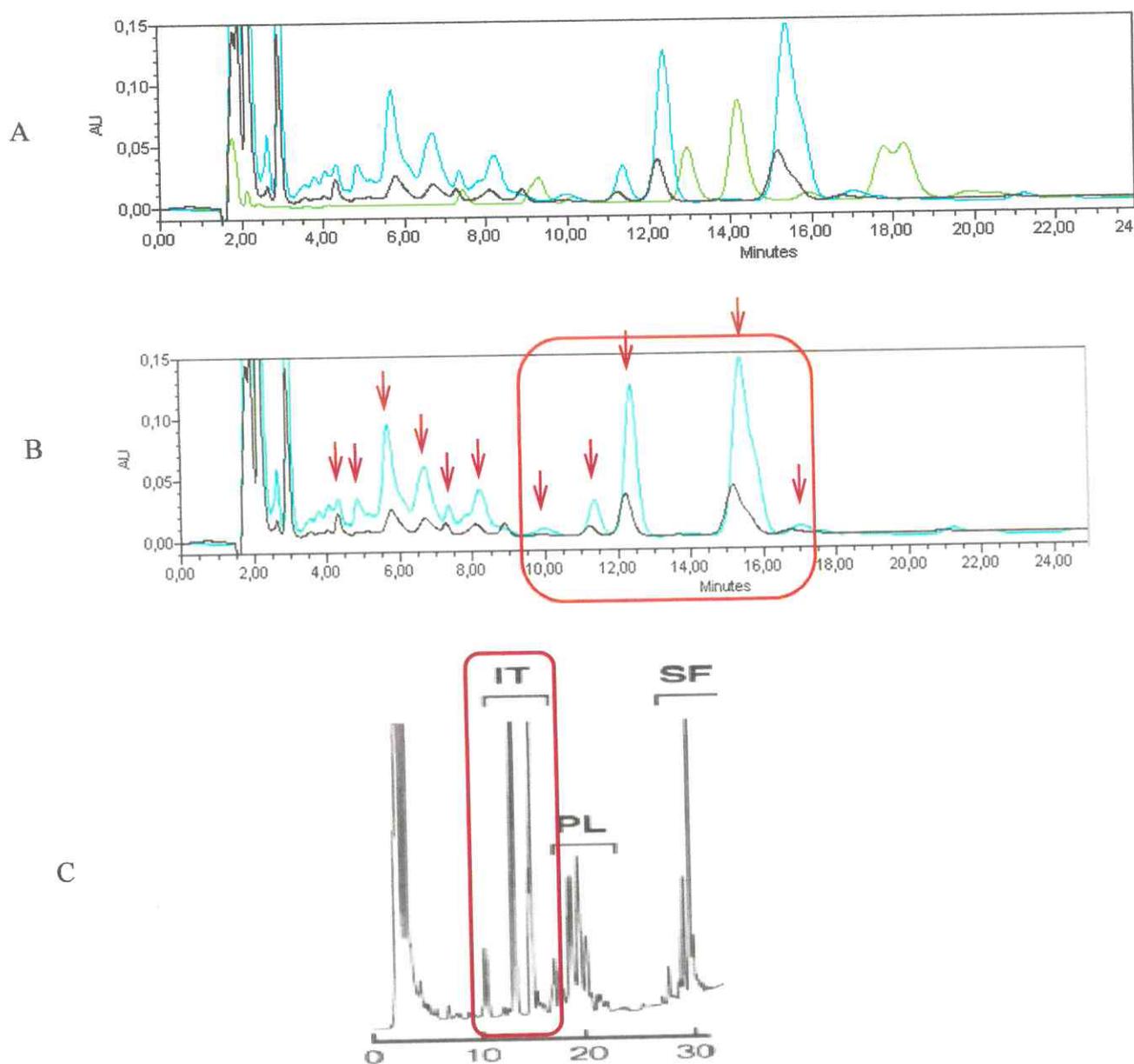


**Figura 24** – Ensaio de espalhamento do óleo. (A) Sobrenadante da cultura Jag248; (B) SDS a 10%; (C) Tween 80; (D) QUAT puro; (E) Água destilada (controle negativo).

### 5.8. Purificação parcial do biosurfactante

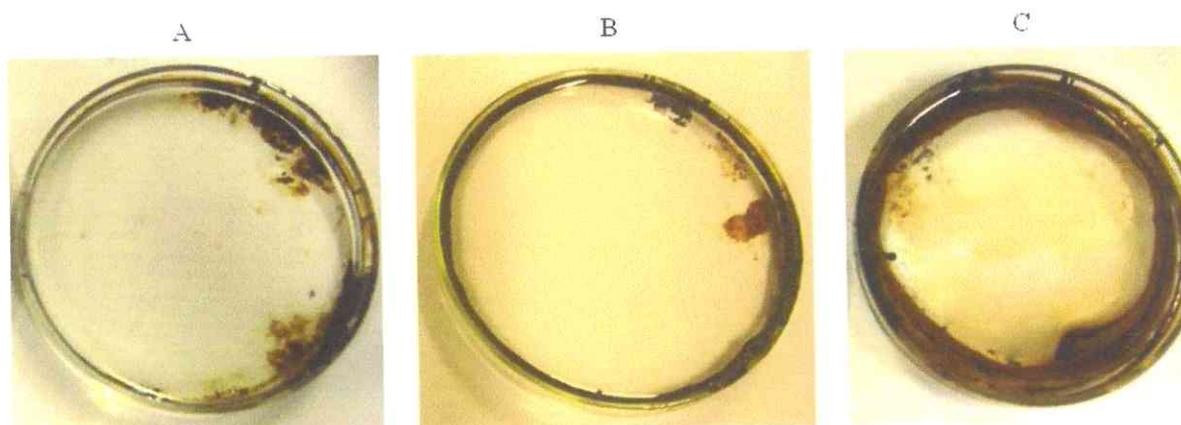
Como mostrado na Figura 25 A, o cromatograma do sistema de biomoléculas pré-purificado de Jag248 foi diferente do perfil da surfactina, biosurfactante conhecido como o mais potente dentre os produzidos por cepas de *Bacillus*. O perfil de Jag248 apresentou intervalo de eluição dos picos semelhante ao exibido pela cepa *B. subtilis* RB14,

reconhecidamente produtora dos lipopeptídeos iturina, plispastatina e surfactina (TSUGE et al, 2005). O aquecimento da amostra pré-purificada reduziu o tamanho dos picos, conforme observado no cromatograma em preto da figura 25 B.



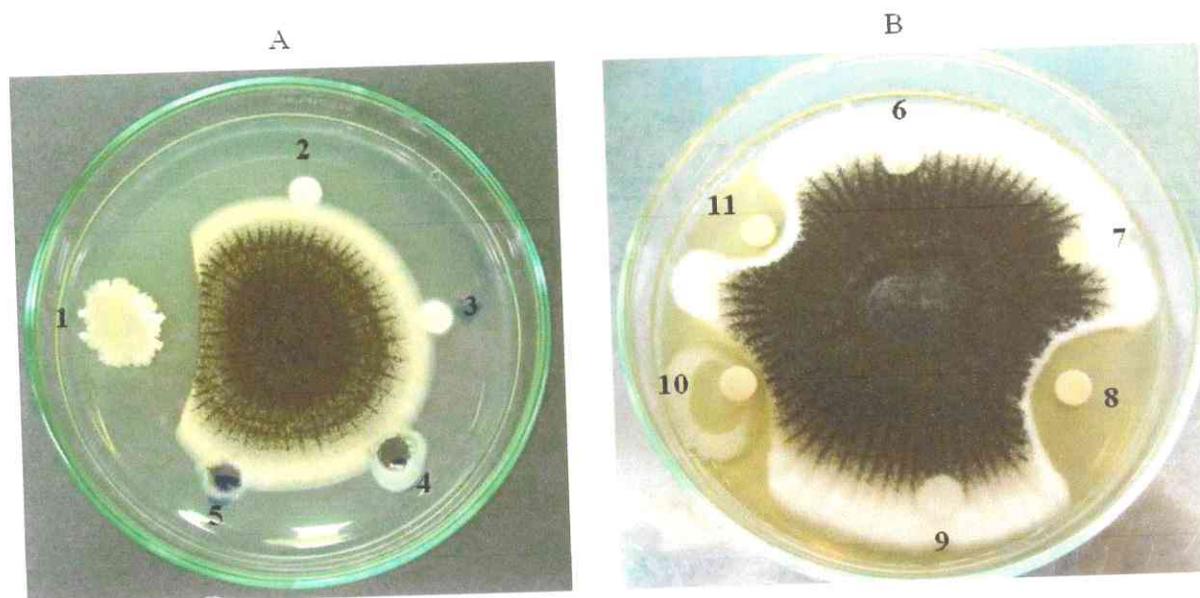
**Figura 25** – (A) Cromatograma do sobrenadante parcialmente purificado não aquecido (azul), aquecido (preto) de Jag248 e da surfactina comercial a 0,5mg/mL (verde). (B) Destaque para o perfil cromatográfico dos produtos de Jag248. Setas vermelhas indicam os picos detectados. (C) Cromatograma dos lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis* RB14, onde IT= Iiturina, PL= Plispastatina e SF = Surfactina (TSUGE et al., 2005), destacando o perfil para iturina. Em vermelho, destaque para os picos com tempos de eluição semelhantes.

Após a purificação parcial, um novo ensaio de espalhamento de óleo foi realizado com os produtos obtidos. Foi observado que o sistema de biomoléculas de Jag248 atuou melhor que a surfactina e que não houve perda da atividade após o aquecimento (Figura 26).



**Figura 26** – Ensaio de espalhamento de óleo após purificação do sobrenadante de Jag248. (A) Purificado de Jag248 não aquecido; (B) Purificado de Jag248 aquecido e (C) Surfactina comercial a 0,5 mg/mL.

Como esta linhagem apresentou forte atividade antifúngica e foi positiva para o gene da iturina, resolveu-se realizar também o ensaio de inibição de fungos com o sobrenadante não tratado e após a purificação. Conforme observado na Figura 27, a inibição ocorreu apenas quando se utilizou o próprio micro-organismo ou seu produto purificado. Esta atividade não foi detectada no sobrenadante bruto.



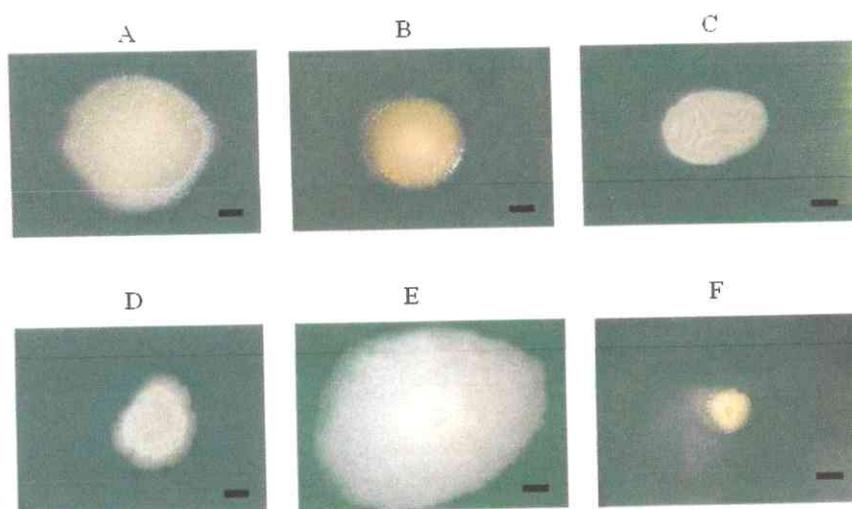
**Figura 27** – Placa A. (1) Inibição de *Aspergillus niger* por Jag248; (2) Controle negativo (água); (3) e (4) sobrenadante filtrado e não tratado, (5) células lisadas de Jag248. Placa B. (6) Controle negativo - extração com diclorometano; (7) Fração extraída com diclorometano; (8) Fração extraída com acetato de etila; (9) Controle negativo - extração com acetato de etila; (10) Fração aquosa; (11) Fração extraída com n-butanol.

### 5.9. Identificação molecular das linhagens selecionadas

A identificação das bactérias do manguezal do Rio Jaguaribe foi realizada apenas com as linhagens promissoras. Os fragmentos obtidos através do sequenciamento foram utilizados de forma a gerar uma sequência única ou consenso de cada isolado (ANEXO C). Segundo análise do rRNA 16S, com a ferramenta BLASTn do *GenBank*, todas as seis bactérias foram classificadas como *Bacillus* sp. (Tabela 6). A caracterização cultural dos isolados selecionados revelou morfologia distinta entre as seis linhagens, evidenciada pela forma, tamanho, coloração e aspecto superficial das colônias (Figura 28).

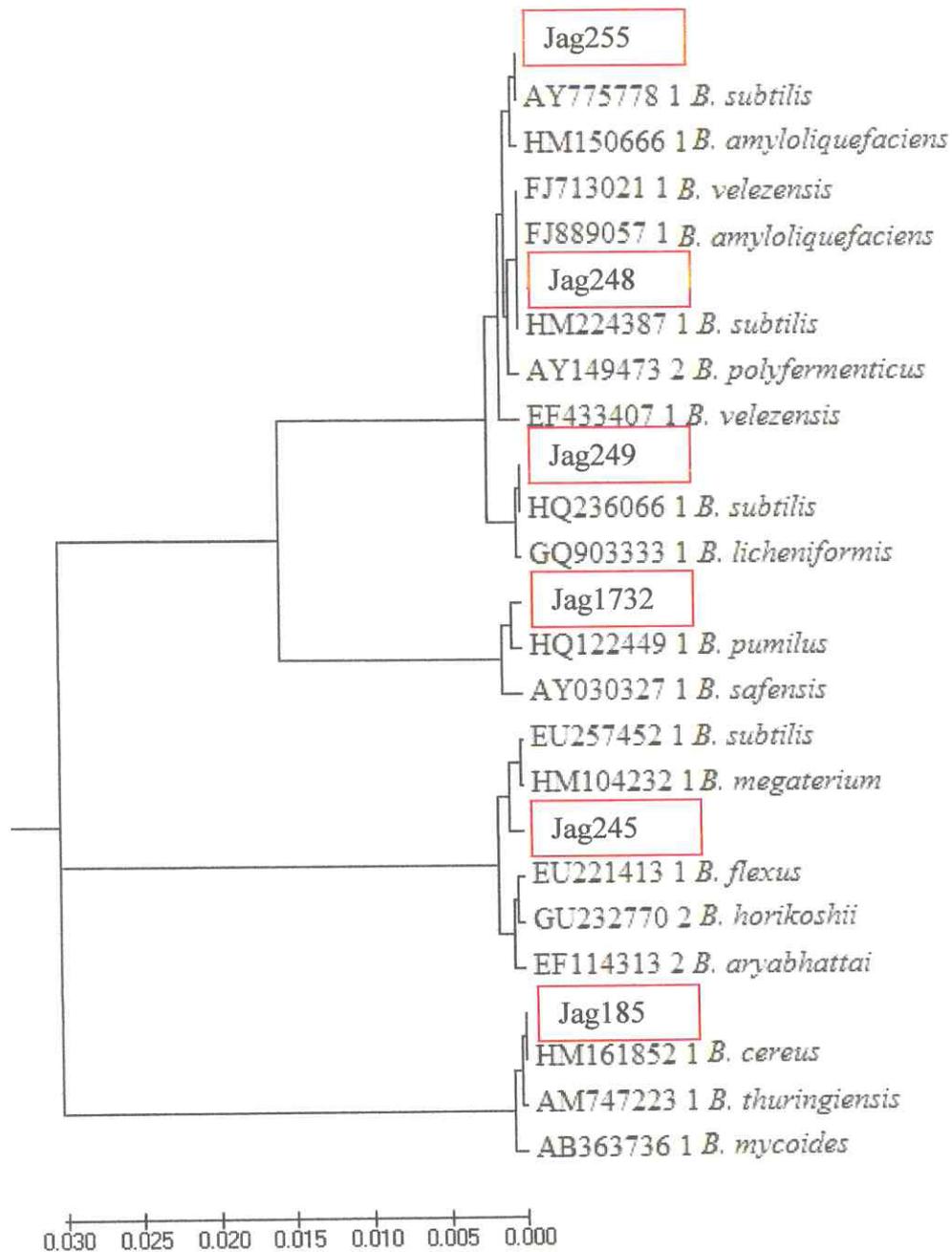
**Tabela 6** – Análise das sequências obtidas do gene do rRNA 16S de cada isolado, utilizando a ferramenta BLASTn do *GenBank*.

<b>Linhagem</b>	<b>Espécies com maior identidade no <i>GenBank</i></b>	<b>Número de acesso</b>	<b>% de Identidade</b>
Jag185	<i>Bacillus cereus</i>	HM161852.1	99%
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	AM747223.1	99%
	<i>Bacillus mycoides</i>	AB363736.1	99%
Jag245	<i>Bacillus megaterium</i>	HM104232.1	99%
	<i>Bacillus subtilis</i>	EU257452.1	99%
	<i>Bacillus horikoshii</i>	GU232770.2	99%
Jag248	<i>Bacillus subtilis</i>	HM224387.1	100%
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	FJ889057.1	100%
	<i>Bacillus velenzensis</i>	FJ713021.1	100%
Jag249	<i>Bacillus subtilis</i>	HQ236066.1	100%
	<i>Bacillus licheniformis</i>	GQ903333.1	99%
Jag255	<i>Bacillus subtilis</i>	AY775778.1	100%
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	HM150666.1	99%
	<i>Bacillus polyfermenticus</i>	AY149473.2	99%
Jag1732	<i>Bacillus pumilus</i>	HQ122449.1	100%
	<i>Bacillus safensis</i>	AY030327.1	100%



**Figura 28** - Caracterização cultural das linhagens selecionadas dentre os isolados do solo do manguezal. Cultivo em meio ATGE a 30 °C por 24 h (Aumento de 6,4x). Escala de 1,0 mm. (A) Jag185; (B) Jag245; (C) Jag248; (D) Jag249; (E) Jag255; (F) Jag1732.

Em relação à análise filogenética dos selecionados do manguezal, o dendograma mostrou a formação de três grupos principais (Figura 29). O primeiro grupo reuniu quatro linhagens (Jag255, Jag248, Jag249 e Jag1732) juntamente com 11 sequências provenientes do *GenBank*. O segundo grupo foi formado pelo isolado Jag245 e mais cinco sequências provenientes do *GenBank*, enquanto o terceiro grupo, por Jag185 e mais três sequências do *GenBank*. Dessa maneira, das seis linhagens, Jag245 e Jag185 apresentam menor similaridade com os demais.



**Figura 29** – Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbour-Joining* (SAITOU & NEI, 1987) demonstrando as relações evolutivas entre as linhagens de bactérias estudadas e linhagens de micro-organismos relacionados com base na sequência do gene ribossomal 16S.

# Discussão

---



## 6. DISCUSSÃO

A pesquisa dos micro-organismos foi feita em três regiões distintas do manguezal do Jaguaribe, visando cobrir diferentes habitats do ecossistema e aumentar as chances de encontrar micro-organismos produtores de surfactantes. Cada um dos ambientes analisados apresentou características abióticas bem distintas, devido principalmente ao grau de influência da maré. Avaliando os parâmetros abióticos (Tabela 5, página 66), percebe-se que as maiores diferenças entre os pontos estão na relação silte e argila e no teor de matéria orgânica. Os maiores valores para cada uma dessas variáveis foram encontrados nos pontos P2 e P3, os quais apresentaram respectivamente  $62,3\% \pm 2,70$  e  $67,5\% \pm 4,62$  de silte e argila e  $9,3\% \pm 0,25$  e  $7,6\% \pm 0,33$  de matéria orgânica. Esses resultados podem ser entendidos quando se analisa que nestes pontos a vegetação é bastante desenvolvida e a área está sujeita à menor hidrodinamismo, favorecendo o acúmulo de matéria orgânica. Sendo o ponto P2 corresponde à região de rizosfera de *Rhizophora* e o P3, a de *Avicennia*, a baixa influência da maré aliada às raízes pronunciadas e de penetração profunda, reduzem as correntes e favorecem a retenção de grãos mais finos. A baixa energia com predomínio de acúmulo de frações finas explica a granulometria encontrada para cada uma das amostras. Nos manguezais a hidrodinâmica local exerce papel fundamental na seleção da granulometria do solo, interferindo diretamente no acúmulo de matéria orgânica (FERREIRA et al., 2007). Os valores de salinidade variaram de 35 a 45, o que mostra uma forte influência marinha neste ecossistema, cujos teores foram superiores a da água do mar. Isso pode ser entendido como uma reflexo de mudanças globais que têm alterado a dinâmica costeira, provocando o avanço do mar sobre no continente (MAIA & LIMA, 2004). Analisando os valores de pH, estes não oscilaram na profundidade estudada (0-10 cm) confirmando o efeito tamponante da água marinha que percola no solo do manguezal. A manutenção do pH próximo à neutralidade é fundamental para garantir a viabilidade dos macro e micro-organismos que residem nesse ecossistema.

Os resultados de isolamento microbiano mostraram que o aquecimento do solo do manguezal a 80 °C por uma hora foi uma estratégia eficaz para selecionar bactérias com características de *Bacillus*, ou seja, Gram positivas, com formato de bastonete e produtoras de esporos (Figura 7, página 68). Os esporos são estruturas altamente resistentes que garantem a manutenção da viabilidade celular por um longo período de tempo, mesmo

quando as condições externas são desfavoráveis para o crescimento do micro-organismo. Quando em condições ideais, tornam-se potencialmente capazes de originar uma nova célula vegetativa, através do processo de germinação (MADIGAN et al., 2010). Selecionar bactérias com essa característica foi uma forma de facilitar a recuperação de linhagens de *Bacillus*, já que esse gênero abrange espécies produtoras do biossurfactante mais eficiente que se conhece, a surfactina, a qual pode ser sintetizada por *B. subtilis* (MIZUMOTO; HIRAI; SHODA, 2007), *B. coagulans* (HUSZCZA & BURCZYK, 2006), *B. pumilus* e *B. licheniformis* (NEU, 1996; PEYPOUX, BONMATIN & WALLACH, 1999).

Para avaliar a produção de biossurfactantes e/ou bioemulsificantes pelos isolados do manguezal do Rio Jaguaribe foram utilizadas respectivamente as metodologias de redução da tensão superficial e atividade emulsificante. Todos os procedimentos foram realizados com o sobrenadante livre de células, de culturas com 48 h de crescimento. Os resultados gerais destes ensaios mostraram características bastante diversificadas entre os micro-organismos analisados. O critério adotado para selecionar um micro-organismo como bom produtor de tensoativos foi apresentar valor de tensão superficial final abaixo de 40 mN/m (COOPER, 1986); enquanto que como bom produtor de emulsificante foi considerado todo aquele cujo valor de emulsificação foi maior ou igual a 40% (YOUSSEF et al., 2004). De acordo com a análise estatística de agrupamento (Figura 8, página 69), foram selecionadas cinco linhagens como boas produtoras de biossurfactantes – Jag248, Jag252, Jag263, Jag263.1 e Jag1732 (Figura 9, página 70) – enquanto que para síntese de emulsificantes foram escolhidos seis isolados: Jag185, Jag191, Jag198, Jag212, Jag242 e Jag310 (Figura 10, página 70). As linhagens do ponto P2 Jag245, Jag249, Jag251 e Jag255 (Figuras 9 e 10, página 70) foram eficientes tanto para a produção de biossurfactantes como de emulsificantes. Já o sobrenadante de Jag248 apresentou resultados que sugerem a produção de um desemulsificante (Figura 11, página 71). Com base nesses resultados observamos a eficiência da análise utilizada que tem como princípio agrupar os dados com maior semelhança entre si. A escolha da estatística por agrupamento foi fundamental para que linhagens em potencial não fossem perdidas, caso a seleção fosse baseada apenas nos dados brutos dos experimentos. A análise apenas visual dos resultados certamente excluiria as linhagens Jag251, Jag252, Jag263 e Jag263/1, devido aos valores ainda elevados de tensão superficial final se comparado às outras linhagens selecionadas. Dessa forma, pode-se perceber com maior clareza a importância da aplicação do teste estatístico.

A literatura reporta alguns estudos nos quais foram pesquisados micro-organismos do solo para a produção de biossurfactantes. Ruggeri e colaboradores (2009) pesquisaram a produção de biossurfactantes e bioemulsificantes em 80 linhagens recuperadas de 13 amostras de solo e água contaminados com derivados de petróleo. Esses autores conseguiram selecionar isolados com potencial para produzir biossurfactantes ou emulsificantes. Apenas uma linhagem identificada como *Cupriavidus* sp. BSNC28C foi capaz de produzir as duas moléculas. Esta linhagem, juntamente com duas de *Pseudomonas* sp. foram as únicas que conseguiram reduzir a tensão superficial do meio a valores abaixo de 40 mN/m, podendo, por isso, serem consideradas promissoras. Mercadé e colaboradores (1996) isolaram 44 linhagens de solo contaminado. Cinco destas apresentaram capacidade de degradar óleo lubrificante mediada pela produção de biossurfactantes. Willumsen e Karlson (1997), a partir de solo contaminado por hidrocarbonetos poli-aromáticos (HPA), recuperaram 57 isolados capazes de crescer em meio contendo HPA. Apenas quatro deles apresentaram atividade tensoativa. Rahman e colaboradores (2003) isolaram 130 linhagens de solo contaminado por petróleo sendo que apenas duas foram capazes de crescer em óleo bruto e produzir biossurfactantes. Confrontando os trabalhos anteriormente citados com o presente estudo, concluímos que os resultados de seleção de micro-organismos produtores de biossurfactantes foram bastante promissores. De 100 linhagens recuperadas do solo, obtivemos seis potencialmente produtoras de emulsificantes, cinco, de biossurfactantes, quatro que sintetizam moléculas com essas duas características e uma que produz um desemulsificante.

Das nove linhagens indicadas como melhores produtoras de biossurfactantes (Figura 9, página 70), algumas conseguiram reduzir a tensão superficial em torno de 50%. A produção de emulsificantes e biossurfactantes por *Bacillus* é constitutivamente estimulada por glicose e pode ser induzida por compostos hidrofóbicos (HAFERBURG et al., 1986). No manguezal estudado, estas biomoléculas podem desempenhar funções ecologicamente importantes para os micro-organismos produtores. Segundo Raajmakers e colaboradores (2010) os lipopeptídeos de *Bacillus* apresentam três funções naturais, as quais envolvem o antagonismo contra outros micro-organismos, a motilidade e a adesão a superfícies. Outros autores ainda destacam a importância dessas moléculas como sinalizadoras no crescimento e diferenciação celular (ONGENA & JACQUES, 2008, LOPEZ et al., 2009).

Ainda se tratando do isolamento, observamos que a maioria das bactérias selecionadas como produtoras de biossurfactantes e bioemulsificantes foi recuperada do solo de rizosfera de *Rhizophora mangle*, ponto P2. Isto pode ser entendido ao analisarmos que neste ponto o teor de matéria orgânica foi o mais elevado (Tabela 5, página 66), o que favorece a ocorrência de comunidades microbianas mais densas e com maior diversidade, aumentando, portanto, a probabilidade de se encontrarem linhagens microbianas produtoras de lipopeptídeos. Nos micro-nichos, essas biomoléculas têm grande importância ecológica, pois regulam, através de sinalizações químicas, o tamanho das populações microbianas por *quorum sensing*. (ONGENA & JACQUES, 2008). Esse fator aliado ao tamanho das partículas do solo, atua na seleção e distribuição dos micro-organismos no ambiente, pois fornece substratos e nutrientes essenciais ao crescimento microbiano (Van GESTEL, MERCKX & VLASSEK, 1996). Segundo Sessitsch e colaboradores (2001), não apenas a biomassa, mas também a estrutura da comunidade é significativamente afetada pelo tamanho da partícula do solo, sendo a maior diversidade microbiana observada em frações de argila (0,1 - 2  $\mu\text{m}$ ) e de silte (2 - 63  $\mu\text{m}$ ), as quais também consistiram na fração mais significativa do solo no ponto P2.

Outro importante fator que pode explicar a maioria dos produtores de biossurfactantes ter sido proveniente de P2 é a concentração de ferro no solo. Por meio de análises físico-químicas do solo foram detectados 65,8% de ferro na forma de pirita na amostra rizosfera de *Rhizophora mangle* contra 20,8% nas proximidades do Rio Jaguaribe e 0,63% na rizosfera de *Avicennia schaueriana* (NOGUEIRA (2011), comunicação pessoal). Essa diferença nas concentrações de ferro, além de promover três ambientes bem distintos dentro do manguezal, atua como fator seletivo sobre as comunidades microbianas de cada local, tanto no que se refere à diversidade de espécies, como na abundância de cada uma delas. Analisando sob a óptica da produção dos biossurfactantes, outra observação que merece ser reforçada é a de que micro-organismos produtores dessas moléculas o fazem melhor quando na presença de ferro. Segundo Cooper e colaboradores (1981) a adição de ferro no meio para produção de biossurfactantes aumenta o rendimento de surfactina sintetizada por *B.subtilis*. Wei & Chu (1998) relataram um aumento de dez vezes na produção de surfactina quando a concentração de ferro no meio foi aumentada para 4 $\mu\text{M}$ , resultando em níveis maiores que os atribuídos a cepas geneticamente selecionadas.

Nossos resultados referentes à produção de tensoativos e emulsificantes (Figuras 9 e 10, página 70) corroboram com a observação de Ron e Rosenberg (2001), segundo a qual nem todo biossurfactante constitui um bioemulsificante, e que as duas propriedades estudadas não apresentam, obrigatoriamente, correlação. Foram observados diversos perfis de produção dessas moléculas dentro de um grupo de micro-organismos pertencentes à mesma amostra de solo; o que, do ponto de vista ecológico, certamente agrega vantagens à comunidade microbiana, pois possibilita a adesão a diversos nichos (ONGENA & JACQUES, 2008). Algumas moléculas podem reduzir a tensão interfacial, desestabilizando a organização entre duas fases, como fazem os surfactantes, mas não obrigatoriamente estabilizar emulsões formadas pela mistura dessas duas fases, atividade conferida aos emulsificantes (RON & ROSENBERG, 2001; YOUSSEF et al., 2004; BENTO, CAMARGO & GAYLARDE, 2008).

Tendo a surfactina isolada por Yeh, Wei e Chang (2005) como referencial, que reduz a tensão superficial da água de 72 mN/m para 27 mN/m a concentrações abaixo de 20 $\mu$ M podemos ressaltar a importância dos resultados obtidos neste trabalho, pois os micro-organismos estudados conseguiram reduzir de forma acentuada a tensão inicial do meio de cultura, o qual era de 60mN/m para em torno de 30 mN/m, em alguns casos (Figura 9, página 70). Importante destacar que os valores alcançados foram registrados a partir da análise dos biossurfactantes brutos, isto é, com os sobrenadantes das culturas. Segundo Cooper (1986), micro-organismos que apresentam reduções na tensão superficial menores que 40 mN/m são promissores para produção de biossurfactantes. As linhagens selecionadas neste trabalho encaixam-se neste perfil.

Os resultados de atividade emulsificante dos sobrenadantes livres de células mostraram que 10 linhagens apresentaram valores de E24 entre 40,5% e 61,6% (Figura 9, página 70). Segundo Youssef et al. (2004), valores de emulsificações maiores ou iguais a 40% são encorajadores, merecendo um estudo mais aprofundado dos micro-organismos produtores. É possível que o número de bactérias produtoras de emulsificantes dentre os testados fosse maior. Este resultado pode variar de acordo com o hidrocarboneto utilizado no teste, fator de certo modo, seletivo. Priya e Usharani (2009) estudaram a produção de biossurfactantes por oito bactérias isoladas através de ensaios de emulsificação utilizando querosene, petróleo, diesel e óleo vegetal. No trabalho citado, foi possível observar a

variação do índice de emulsificação obtido para uma mesma bactéria, quando modificada a fonte de hidrocarboneto utilizada. Essa variação reflete seletividade do biossurfactante, ratificando a propriedade dessas moléculas de apresentarem alta especificidade com o substrato apolar que interagem. Dessa forma, índices de emulsificação diferentes poderiam ter sido observados com outros hidrocarbonetos ou outras linhagens produtoras poderiam ter sido detectadas. Navon-Venezia e colaboradores (1995) mostraram que o emulsificante Alasan, produzido por *Acinetobacter radioresistens*, foi eficiente em emulsificar compostos alifáticos de cadeia longa, mas não apresentou os mesmos resultados com os de cadeia curta, como o pentano e compostos aromáticos como o benzeno e o xileno. Liu e colaboradores (2010) também obtiveram valores de emulsificação que oscilaram entre 60 e 100% de acordo com o hidrocarboneto-teste. Foram testados benzeno, xileno, n-pentano, n-nonano, gasolina e óleo diesel com um biossurfactante de *B. subtilis* AB93108.

Muitos trabalhos registraram a produção de biossurfactantes por cepas de *Bacillus* com emulsificações de querosene de 40 até 65 %, como observado por Pruthi e Cameotra (1997), Davis, Lynch e Varley (2001), Gouveia e colaboradores (2003) e Nitschke e Pastore (2003). Todos esses autores obtiveram valores de emulsificação superiores a 40% após um crescimento de, no mínimo 48 h, tempo necessário para as linhagens deste trabalho, expressarem a produção dos biossurfactantes.

O experimento de emulsificação utilizando o sobrenadante de Jag248 nos despertou a atenção (Figura 11, página 71). Após a agitação vigorosa do sistema sobrenadante e querosene, observou-se a formação de uma intensa e estável camada emulsificante. Entretanto, após 24 h, esta mistura se desfez de tal modo que foi possível recuperar praticamente todo o querosene inicial utilizado no experimento. Este fenômeno nos levou a verificar a possibilidade desse sobrenadante romper emulsões bastante estáveis, como as promovidas por Tween 80, o qual foi utilizado como controle positivo. A adição de 300 µL do sobrenadante da cultura de Jag248 na emulsão Tween 80-querosene ocasionou a separação completa destes compostos após 30 dias de repouso do sistema. Da mesma forma, foi possível recuperar o querosene. A capacidade de separar emulsões nos levou a inferir que no sobrenadante da cultura analisada haveria moléculas com propriedades desemulsificantes.

As emulsões estáveis de óleo são necessariamente produzidas durante as várias etapas de produção e processamento do petróleo, a fim de se reduzir a viscosidade do óleo e facilitar o seu transporte. No entanto, essas emulsões tornaram-se um dos maiores problemas para a indústria petroquímica, pois precisam ser desfeitas em algum momento de modo a possibilitar a recuperação das fases de interesse. A estabilidade dessas emulsões é diretamente afetada pela viscosidade do óleo, razão superfície/volume das gotículas na emulsão, temperatura, pH, tempo de formação da emulsão, tipo de agente emulsificante, densidade e agitação. Água e resíduos dentro dos tanques de armazenamento e nas tubulações de transporte de petróleo podem causar corrosão, sendo necessários diversos tratamentos dispendiosos com calor e detergentes para remoção desses contaminantes (DAS, 2001; VAN HAMME & URBAN, 2009).

Neste contexto, os desemulsificantes microbianos têm atraído bastante atenção em pesquisas recentes devido à baixa toxicidade, fácil biodegradabilidade e viabilidade econômica, se comparado aos desemulsificantes químicos (SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007). Espécies de *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Torulopsis*, *Acinetobacter*, *Alteromonas*, *Aeromonas* e algumas culturas mistas são conhecidas por possuírem propriedades desemulsificantes. Entretanto, a aplicação dos desemulsificantes *in situ* ainda encontra-se em fase de testes, devido ao fato dessas moléculas apresentarem diferentes níveis de resposta de acordo com as características do óleo e das condições ambientais (ZAKI, 1997; SINGH; VAN HAMME; 2007; WARD et al., 2009).

A análise molecular para pesquisa do gene *sfp*, gene indicador de espécies de *Bacillus* produtores de surfactina, mostrou que apenas as linhagens Jag15B, Jag185 e Jag249 apresentaram este gene (Figura 12 A, página 72). No trabalho desenvolvido por Hsieh e colaboradores (2004) 35 cepas de *Bacillus*, sendo 15 padrões e 20 obtidas de amostras ambientais, foram avaliadas quanto à produção de surfactina através dos experimentos de atividade hemolítica, reação em cadeia da polimerase (PCR), e por quantificação em HPLC. Os resultados das análises por PCR e por HPLC foram idênticos, confirmando quais cepas eram realmente produtoras do biosurfactante.

Em nosso trabalho, a detecção de apenas três linhagens produtoras de surfactina não nos pareceu um resultado desanimador, visto que encontrar em um ambiente tão complexo como o solo de manguezal, micro-organismos produtores especificamente desse biossurfactante não se constitui uma tarefa fácil (DANIEL, 2004). Hsieh e colaboradores (2004) citam que somente em torno de 20 cepas de *Bacillus*, pertencentes a bancos públicos ou privados, têm sido listadas como produtoras desse lipopeptídeo. Ainda, o fato das outras linhagens não terem apresentado o gene em questão, não exclui a possibilidade desses micro-organismos produzirem outros tipos de biossurfactantes. Isso pode ser facilmente confirmado ao confrontar os dados da frequência do gene *sfp* nos isolados com os de tensão superficial, o que nos permite concluir que outros tipos de biossurfactantes, que não a surfactina, foram produzidos por algumas das linhagens estudadas (Figura 9, página 70).

Observando apenas os valores de redução de tensão superficial das linhagens possuidoras do gene *sfp*, Jag15B ( $41,8 \text{ mN/m} \pm 1,5$ ), Jag185 ( $46,0 \text{ mN/m}$ ) e Jag249 ( $29,4 \text{ mN/m} \pm 1,4$ ) - dados em ANEXO B, página 142 - temos que Jag249 foi a mais eficiente na produção de biossurfactante. Em se tratando dos índices de emulsificação, os quais foram, respectivamente,  $13,4\% \pm 3,6$ ;  $57,0\%$  e  $54,6\% \pm 2,5$  - dados em ANEXO A, página 139 - Jag185 e Jag249 apresentaram os melhores resultados, sugerindo a produção de emulsificantes por estas linhagens. Estes dados reforçam a idéia de que a expressão dos genes para a produção de tensoativos está diretamente relacionada às condições de cultivo microbiano e que a intensidade de síntese dessas moléculas pode variar muito, mesmo em micro-organismos da mesma espécie (HSIEH et al., 2004). Além disso, algumas cepas produtoras de lipopeptídeos podem gerar mais de um tipo dessas moléculas, tais como *B. subtilis* RB14, YB8 e ATCC6633 as quais são produtoras respectivamente de surfactina, iturina A e plipastatina; surfactina e plipastatina B1; surfactina e micosubtilina. Essa produção depende diretamente das condições de crescimento fornecidas (HUANG, ANO & SHODA, 1993; TSUGE, ANO & SHODA, 1996; DUITMAN et al., 1999; VAN HAMME & URBAN, 2009).

Tendo isso em mente, resolvemos realizar ensaios paralelos ao trabalho principal desta tese, nos quais outro lipopeptídeo de *Bacillus*, a iturina, foi pesquisado por PCR. Esta molécula apresenta grande semelhança estrutural com a surfactina e é considerada, por

muitos autores, um excelente antifúngico. Esse potencial já foi investigado em diversos trabalhos, tendo como referenciais mais recentes as revisões de Ongena e Jacques (2008) e de Raaijmakers e colaboradores (2010). Nossa curiosidade para verificar a presença deste gene nos isolados do solo do Jaguaribe foi despertada quando não encontramos correlação entre a presença do gene para surfactina e a síntese de biosurfactantes tão eficientes como o de Jag248. Embora iturina seja primordialmente citada como antifúngico, alguns autores classificam esse lipopeptídeo também como um biosurfactante (AHIMOU, JACQUES & DELEU, 2000; MUKHERJEE & DAS, 2005).

Os genes utilizados para pesquisa das linhagens produtoras de iturina foram *ituD* e *lpa14*, que codificam respectivamente a coenzima manolil A transacilase, sem a qual a iturina não pode ser sintetizada (TSUGE, AKIYAMA & SHODA, 2001), e fosfopanteteinil transferase, requerida para a maturação da iturina após sua síntese. Segundo Hsieh e colaboradores (2008), ambos os genes são fundamentais para a produção de iturina e, por isso, são pesquisados em conjunto para identificação de linhagens de *Bacillus* produtoras desse lipopeptídeo.

O ensaio de PCR utilizando os *primers lpa14* e *ituD*, permitiu detectar a presença dos genes para síntese desta molécula nas linhagens Jag227, Jag230, Jag248 e Jag255 (Figura 12 B, página 72). Ensaio paralelos de atividade antifúngica foram realizados com esses isolados contra *Aspergillus niger*, *Penicillium hergueli*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor* sp. e *Pythium oligandrum*, sendo Jag248 a única que inibiu o crescimento de todos os fungos testados. Importante destacar a atividade esporicida bastante efetiva, observada contra *Mucor* sp. e *Penicillium hergueli* (Figura 13, página 73 e Figura 14, página 74). As espécies de fungos utilizadas neste ensaio foram escolhidas devido a sua importância econômica, por serem fitopatógenos e pelo potencial em contaminar e deteriorar alimentos. Além disso, neste teste procurou-se investigar a capacidade das linhagens microbianas em inibir o crescimento de fungos com diferentes constituições de parede celular. Com exceção de *Mucor* sp., que apresenta parede de celulose, os outros fungos apresentam parede formada por quitina. A inibição de todos os fungos por Jag248 permitiu reafirmar que esta ação deveu-se à produção de iturina e não de enzimas de degradação das paredes fúngicas. Como não estava no enfoque deste estudo, a pesquisa aprofundada dessa atividade ficou reservada para uma abordagem em outro trabalho desenvolvido por nosso

grupo. No entanto, não podemos deixar de comentar que a existência de bactérias produtoras de antifúngicos em solo de manguezal certamente tem um valor ecológico importante, no que diz respeito ao controle do equilíbrio das comunidades microbianas do solo.

Em posse desses resultados, as linhagens Jag185, Jag245, Jag248, Jag249, Jag255 e Jag1732 foram selecionadas para prosseguimento dos ensaios de dispersão do óleo. Esses isolados foram os que apresentaram os melhores valores de redução de tensão superficial e/ou de emulsificação. Antes do ensaio de dispersão, foi realizado um teste preliminar para se determinar qual o volume ideal de sobrenadante seria utilizado a fim de se verificar diferenças de tamanho de áreas limpas na superfície do óleo. Segundo a Figura 15 (página 74) observamos que o volume de 200  $\mu$ L foi considerado ideal para se perceber as diferenças desejadas, visto que a partir desse volume, os halos foram máximos para cada um dos micro-organismos utilizados neste ensaio.

No teste de dispersão do óleo com as linhagens selecionadas, Jag248, Jag249 e Jag255 foram os que apresentaram resultados positivos, com halos superiores a 50% do diâmetro da placa (Figura 16, página 75). Destacam-se neste grupo Jag248 e Jag255, cuja dispersão foi estável, ou seja, sem retorno do óleo, e ocorreu rapidamente, segundos após a adição do sobrenadante no filme de óleo. Interessante notar que essas duas linhagens foram positivas para os genes de iturina, o que nos permitiu questionar se essa atividade tensoativa era devido a esse lipopeptídeo.

Os resultados de dispersão de óleo em água revelaram-se bastante promissores (Figura 16, página 75). Comparado com os existentes na literatura, as dispersões obtidas destacam-se em dois aspectos: o primeiro deles trata-se da quantidade de óleo utilizada no experimento. Em geral, este ensaio é realizado com 20  $\mu$ l de óleo (YOUSSEF et al., 2004). Neste trabalho, foi utilizado 0,5 g de petróleo pesado, correspondente a aproximadamente 2,0 mL, ou seja, 100 vezes mais que o padrão. O segundo aspecto diz respeito ao fato dos sobrenadantes não terem sido purificados antes do ensaio. Dessa forma, podemos especular que halos maiores de dispersão de óleo poderão ser obtidos ao utilizar os produtos purificados.

Satpute e colaboradores (2008) trabalharam com 112 isolados e testaram oito técnicas de seleção de produtores de biossurfactantes. Concluíram que a combinação das técnicas de espalhamento de óleo, atividade emulsificante e colapso da gota são as mais adequadas para uma seleção inicial de grande número de linhagens. Youssef e colaboradores (2004), utilizando 205 linhagens, analisaram quatro métodos de detecção de micro-organismos produtores de biossurfactantes: espalhamento do óleo, atividade hemolítica, tensão superficial e teste do colapso da gota. Analisando o teste do espalhamento do óleo, esses autores afirmam a ocorrência de uma relação linear entre quantidade de biossurfactante na cultura e tamanho do halo, bem como uma relação inversa deste último valor com os de tensão superficial. Nossos dados concordam com esta relação, mesmo que de forma bastante sutil. Para Jag248 os valores de tensão e tamanho do halo foram respectivamente  $30,6 \text{ mN/m} \pm 0,6$  e  $8,85\text{cm} \pm 0,3$ , enquanto que para Jag255 foram  $29,6 \text{ mN/m} \pm 0,6$  e  $9,00\text{cm} \pm 0,2$ . O método de espalhamento do óleo foi considerado o melhor utilizado por esses autores, inclusive na realização de análises com grande número de linhagens, como a realizada neste estudo.

A identificação molecular das seis linhagens selecionadas mostrou que todas elas pertencem ao gênero *Bacillus* (Tabela 6, página 87). No entanto, como o percentual de identidade foi muito elevado com espécies distintas, não foi possível inferir a espécie exata para cada isolado. No dendograma, observa-se que diferentes espécies algumas vezes distaram entre si valores próximos ou equivalentes a 0.001, dificultando a determinação das espécies para as linhagens do manguezal. Novamente, agora baseado na análise do rRNA 16S, *Bacillus* sp. Jag248 e *Bacillus* sp. Jag255 permaneceram no mesmo grupo e apresentaram maior identidade com duas cepas de *B. subtilis*, indicando uma proximidade entre essas linhagens (Figura 29, página 89). Importante destacar que ambas as cepas apresentaram elevada similaridade com micro-organismos não patogênicos, reforçando ainda mais o valor desses micro-organismos para aplicações práticas seguras.

Priest, Goodfellow e Todd (1988) relataram as dificuldades da diferenciação de espécies pertencentes ao gênero *Bacillus*, principalmente com a classificação que vigorava anteriormente, onde o gênero era constituído por mais de 150 espécies, tendo por base características fisiológicas e ecológicas. Em seguida, métodos de classificação baseados na forma, tamanho e localização dos esporos, sugeriram a reclassificação do gênero, onde o

número de espécies foi reduzido para 19. Com o surgimento dos métodos moleculares e o estudo do rRNA 16S, a inadequação dessa classificação tornou-se clara. O estudo em questão faz uso de diversas técnicas, tais como testes enzimáticos, análise dos esporos, morfologia da colônia, ensaios de resistência a antimicrobianos, entre outros, para a diferenciação de espécies deste gênero.

Em um artigo recente, Miranda, Martins e Clementino (2008) descreveram o isolamento de 23 bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* de sedimentos marinhos, identificando-os como *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. subtilis* e *B. pumilus*. O trabalho destaca a importância do advento dos métodos moleculares especialmente para estudos de bactérias do gênero *Bacillus*, o qual foi diversas vezes submetido a re-classificações taxonômicas nos últimos anos. Essas informações permitem-nos concluir que mais informações, sejam elas de caráter fisiológico, genético, ecológico ou morfológico, tornam-se necessárias para a identificação e classificação dos isolados selecionados neste trabalho (LIMA, 2010).

Após a realização dos experimentos preliminares de isolamento, seleção microbiana para produção de tensoativos e pesquisa de genes para lipopeptídeos, a cepa *Bacillus* sp. Jag248 foi selecionada, dentre as 100 linhagens estudadas, para produção de biossurfactantes e para os testes de simulação de limpeza de solo e água contaminados com petróleo. Os motivos pelos quais este micro-organismo foi o escolhido referem-se ao fato de Jag248 ter apresentado um perfil de resultados, no mínimo, intrigante. Embora tenha sido negativo para o gene da surfactina, esse micro-organismo apresentou resultados excelentes de redução de tensão superficial do meio (Figura 9, página 70), de atividade desemulsificante (Figura 11, página 71) e de espalhamento de óleo pesado em água (Figura 16, página 75). Aliado a isso, ainda na mesma linhagem foram detectados os genes para o lipopeptídeo iturina (Figura 12, página 72) e excepcional atividade contra fungos com diferentes estruturas de parede celular. Outro fator que impulsionou investigações mais acuradas em *Bacillus* sp. Jag248 foi vislumbrar a possibilidade de utilização deste micro-organismo para produção de biossurfactantes em larga escala, visto se tratar de uma cepa inócua, com elevada similaridade molecular com micro-organismos não-patogênicos (Figura 29, página 89). Todas estas características reunidas em uma só linhagem bacteriana, isolada do solo do manguezal do Jaguaribe, nos levaram a questionar se estas

atividades eram provenientes do mesmo sistema de moléculas ou se derivavam de moléculas de diferentes famílias.

Os ensaios de produção de biossurfactantes por Jag248 iniciaram com a construção da curva de crescimento dessa bactéria em Meio Mineral, conforme proposto por Morán e colaboradores (2000). Para preparar a curva de crescimento foram feitas leituras a cada duas horas, durante 48 h, envolvendo a contagem do número de células viáveis, atividade emulsificante e ensaios de espalhamento de óleo, sendo esses dois últimos com o sobrenadante livre de células.

Os primeiros resultados desta etapa do trabalho, observados nas imagens aliadas ao gráfico da Figura 18 (página 78), mostraram que *Bacillus* sp. Jag248 produziu emulsificantes após sete horas de incubação, já no início da fase estacionária, e que a síntese desses compostos foi reduzida bruscamente com 11h. A síntese de biossurfactante prosseguiu durante a fase estacionária até 40 h de cultivo, onde foi possível observar os maiores tamanhos de halos de espalhamento de óleo. A cada leitura, alíquotas de 10  $\mu$ L da cultura foram subcultivadas em Agar nutritivo coberto com petróleo e, após a incubação, foi possível detectar a produção de biossurfactantes ao redor das colônias, através da formação de halos bem definidos (Figura 18C, página 78). Esses resultados nos permitiram inferir que a produção dessa molécula não está diretamente relacionada com o crescimento celular. A atividade desemulsificante foi detectada apenas com 40 h de cultivo. Em paralelo, o ensaio de espalhamento de óleo mostrou que a produção de tensoativos aumentou com o aumento da biomassa, tendo seu ápice também com 40 h (Figura 18A, página 78). Analisando do ponto de vista industrial, tanto a produção de emulsificantes quanto a de biossurfactantes por esta cepa, em larga escala, parecem interessantes, visto que ocorrem em fases distintas da curva de crescimento. Este comportamento metabólico permite a manipulação da cultura de forma a produzir o produto desejado e, em caso da produção dos dois sistemas de biomoléculas, dispensa as etapas de separação, já que estas podem ser recuperadas em diferentes momentos. Consequentemente, os custos de purificação, que podem chegar até 60% do valor final no caso de produtos biotecnológicos, seriam reduzidos (MUKHERJEE, DAS & SEN, 2006). Em estudos anteriores, Sheppard e Mulligan (1987) relataram que a produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC21332, cepa padrão para produção de biossurfactantes, ocorria principalmente a partir do final da fase

exponencial de crescimento. Esses dados concordam com os encontrados por Nitschke e Pastore (2006), que pesquisaram a produção de biossurfactantes por *B. subtilis* LB5a utilizando manipueira como substrato, e com os do presente trabalho.

Após 11h de cultivo observou-se uma queda na atividade emulsificante. Isso pode ter acontecido por alguns motivos. O primeiro deles diz respeito ao acúmulo de espuma no sistema (Figura 18B, página 78), a qual sequestra o biossurfactante disponível na cultura, podendo também provocar uma inibição da síntese dessas moléculas (COOPER et al., 1981; DAVIS, LYNCH & VARLEY, 2001). Em segundo temos que, a produção de biossurfactantes em sistemas fechados pode atingir concentrações danosas às células, de modo que estas moléculas podem interagir com a membrana celular causando-lhe danos irreversíveis (SHEPPARD et al., 1991; PEYPOUX, BONMATIN & WALLACH, 1999). Uma estratégia para contornar este problema seria a degradação do biossurfactante. De fato, alguns autores descreveram que a produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC21332 pode ser inibida pelo produto final (COOPER et al., 1981; SEN, 1997; NITSCHKE, 2004). Como a produção de lipopeptídeos por *Bacillus* também apresenta uma função ecológica, outra razão para a queda na atividade emulsificante seria a densidade celular elevada que inibe a produção de lipopeptídeos pelo mecanismo de *quorum sensing*. E por último, mas não menos importante, sob estresse fisiológico, os emulsificantes, ricos em aminoácidos e carbono, podem ter sido utilizados pelas células como fonte de nutrientes e energia, necessários para iniciar o processo de esporulação.

Os experimentos de resistência do biossurfactante de *Bacillus* sp. Jag248 a variações de pH mostraram que essa molécula apresentou melhor atividade tensoativa em pH 7,0 (Figura 19, página 79). Wei e Chu (1998) observaram uma queda nos níveis de surfactina quando da adição de ferro ao meio de cultura de *B. subtilis* ATCC21332, porém o decréscimo foi devido à acidificação do meio, que provocou a precipitação do surfactante. A redução nos níveis de biossurfactante no sobrenadante da cultura em pHs ácidos pode justificar os pequenos halos de espalhamento de óleo no experimento de caracterização em diferentes valores de pH (Figura 19, página 79). Em pH ácido, a natureza anfifílica da molécula foi modificada, predominando os sítios protonados. Modificações na configuração da molécula também foram observadas em pH alcalino. Quando neutralizadas novamente, tanto as amostras de pH ácido como as de pH alcalino

retornaram aos mesmos resultados obtidos antes das variações de pH. Este fenômeno mostra que há apenas uma precipitação e, com a neutralização da amostra, ocorre novamente a solubilização do biossurfactante. Esta característica representa uma vantagem adicional do biossurfactante avaliado, pois mesmo quando submetido a condições mais extremas de pH, a atividade tensoativa não foi comprometida (BARROS, QUADROS & PASTORE, 2008).

Em relação aos experimentos de resistência à temperatura, foi observado que a atividade tensoativa permaneceu inalterada, mesmo após o aquecimento do sobrenadante a 121° por 1 h (Figura 26 B, página 85). A resistência a temperaturas tão elevadas nos forneceu argumentos para sugerir que esse biossurfactante pode se tratar de uma molécula com pequena estrutura, típica dos lipopeptídeos. Além disso, a termorresistência viabiliza a utilização desse biossurfactante em processos industriais e em recuperação melhorada do petróleo promovida por micro-organismos (MEOR) (VAN HAMME & URBAN, 2009).

O sistema de biossurfactantes de Jag248 apresentou dois pontos de inflexão na curva da condutividade (Figura 20, página 80). Este resultado decorre de duas formas de interação para a formação das micelas. Inicialmente, as porções hidrofóbicas dos monômeros são repelidas e encontram-se micelas intramoleculares, onde é detectada a primeira mudança de condutividade. A interação entre estas micelas caracteriza a segunda inflexão, na qual ocorre a formação de agregados maiores, onde as porções hidrofóbicas adjacentes interagem entre si, formando micelas intermoleculares (LO et al., 2007). Comparado ao surfactante sintético SDS, os biossurfactantes de Jag248 apresentaram pontos de inflexão em baixas diluições, o que pode ser um indicio de valores de CMC reduzidos, comparado aos descritos na literatura. O SDS, utilizado como padrão para determinações de CMC por condutividade, apresenta uma concentração micelar crítica de 2000 mg/L (MORAES & REZENDE, 2004), enquanto que para o biossurfactante surfactina, essa concentração é de 25 mg/L (COOPER et al., 1981). É importante destacar que estes pontos de condutividade foram obtidos a partir de medidas feitas do sobrenadante não tratado de *Bacillus* sp. Jag248, no qual os biossurfactantes encontram-se diluídos. Independente dos valores de CMC para os biossurfactantes de Jag248, vale salientar ainda que para estas moléculas ocorrem duas concentrações micelares, enquanto para surfactina,

apenas uma. Essa característica destaca outra diferença entre esses dois grupos de biossurfactantes microbianos.

Ao ser vigorosamente misturado com o sobrenadante de *Bacillus* sp. Jag248 observamos que amostras de petróleo apresentaram uma brusca mudança na viscosidade, outro ponto que favorece futuras aplicações deste produto em MEOR (Figura 22, página 82). Uma das formas de extração das porções residuais de petróleo nas rochas, fração que pode constituir até 60% do óleo aprisionado, é através da adição de surfactantes que reduzem a viscosidade do óleo, formando emulsões que podem ser mais facilmente bombeadas para superfície. A utilização de biossurfactantes para a limpeza de tanques, em substituição aos surfactantes convencionais, pode promover a recuperação de até 90% dos hidrocarbonetos presentes no resíduo (VAN HAMME & URBAN, 2009; BANAT et al., 2010).

Os resultados do ensaio de limpeza de solo contaminado por petróleo foram promissores. Primeiramente pela velocidade com que parte do solo foi desligada do óleo. A dessorção foi imediata (Figura 21C e D, página 81), mesmo sendo um solo contaminado com frações mais recalcitrantes. Além disso, neste experimento foi utilizado o sobrenadante não tratado de *Bacillus* sp. Jag248 o que nos permite inferir que a aplicação do produto purificado nos forneceria ainda melhores resultados. Como o ensaio foi realizado apenas durante 24 h e mostrou a recuperação de três vezes mais solo limpo do que o obtido no grupo controle, no qual foi utilizado somente água do mar, podemos especular que aumentando o tempo de contato com o biossurfactante, mais solo pudesse ser recuperado. A dessorção no grupo controle pode ser explicada pela liberação apenas dos grãos de areia que se encontravam na porção superficial da mistura solo e óleo.

Na remediação de solos, as soluções de surfactantes são usadas para transferir a matriz de contaminantes para a fase líquida da solução, onde se medirá a biodegradação do óleo. Mas essa aplicação depende tanto da natureza físico-química do surfactante, quanto do solo contaminado. A remoção dos contaminantes do solo ocorre em duas etapas: mobilização e solubilização. A mobilização, também conhecida como *rollup*, ocorre numa concentração abaixo da CMC, reduzindo a tensão superficial e interfacial entre os sistemas: óleo/água e solo/água. As moléculas de surfactantes adsorvidas na superfície do

óleo causam uma repulsão entre a porção polar do surfactante e o solo, promovendo a separação. Por outro lado, a solubilização ocorre numa concentração acima da CMC, por partição do contaminante dentro do núcleo hidrofóbico da micela. Com o aumento do número de micelas ocorre um aumento na solubilização (DESHPANDE et al., 1999; CORRER et al., 2007). A lavagem do solo (*soil washing*) é uma tecnologia inovadora, devido seu potencial para o tratamento de solos contaminados por petróleo e metais pesados. É um método que consiste na remoção dos contaminantes adsorvidos nas partículas mais finas do solo, além de consumir menos tempo, quando comparado com a biorremediação e fitorremediação (URUM, PEKDEMIR & COPUR, 2004). Os resultados de remoção de óleo em solo, obtidos neste trabalho, mostraram que o sistema de biomoléculas com características tensoativas, detectadas ao longo dos experimentos, apresenta possibilidades de ser testado nesta tecnologia.

Os testes de remoção do petróleo em água marinha também foram promissores. Observamos que, de acordo com a estratégia utilizada para aplicação do biosurfactante, a mancha de petróleo pode se dispersar através da abertura de regiões limpas na superfície da água ou se aglutinar, facilitando sua posterior remoção mecânica (Figura 23, página 83). Embora após o derrame de óleo no ambiente parte dele possa submergir e se acumular no fundo oceânico, é fundamental para a sobrevivência dos organismos da coluna d'água a remoção rápida do filme de óleo da superfície, o qual dificulta as trocas gasosas e bloqueia a passagem de luz solar, indispensável para os produtores. Neste contexto, o ideal é que os detergentes utilizados possam sejam biodegradáveis, como os surfactantes microbianos. Caso contrário, outros compostos tóxicos serão acrescidos ao ambiente já impactado.

Vislumbrando uma aplicação prática do biosurfactante de *Bacillus* sp. Jag248 para remoção de petróleo do ambiente, concluímos que nosso produto pode ser bastante eficiente para essa finalidade. Inicialmente devido aos resultados obtidos nos ensaios de espalhamento de óleo utilizando surfactantes químicos, no qual observamos que apenas QUAT puro, um detergente potente, mas de elevada toxicidade, foi capaz de formar um halo equivalente ao nosso biosurfactante não purificado (Figura 24, página 83). Além disso, o tensoativo microbiano foco desse estudo possibilitou a remoção do óleo sem aparentemente comprometer suas características físicas. Essa observação tem grande valor quando se almeja recuperar o petróleo derramado. Segundo Banat (1995) e Mulligan

(2005), os biossurfactantes são mais efetivos e eficientes que os surfactantes químicos, pois conduzem a baixos valores de tensão superficial e interfacial mesmo em baixas concentrações.

A análise de HPLC confirmou o obtido por análise molecular, pois descartou a produção de surfactina por esse micro-organismo, cujos genes amplificaram somente para os iniciadores de iturina (Figura 12 B, página 72 e Figura 25 A, página 84). Além disso, o cromatograma do sistema de biossurfactantes em estudo exibiu picos bem definidos sugerindo sucesso nas etapas de pré-purificação (Figura 25 B, página 84). Comparado ao perfil cromatográfico da cepa padrão para a produção de iturina, *B.subtilis* RB14 (TSUGE, AKIYAMA & SHODA, 2001), temos que os picos maiores do sistema de moléculas pré-purificado de Jag248 foram detectados no mesmo intervalo do exibido pela cepa padrão, entre 12 e 16 minutos (Figura 25 C, página 84). Importante destacar ainda que para RB14, plipastatina e surfactina eluem em momentos distintos da iturina, não ocorrendo sobreposição de picos quando dos produtos purificados. A literatura descreve que para outras cepas de *B. subtilis*, como NB22 (PHAE & SHODA, 1991) e AP-3 (ARAÚJO, HENNING & HUNGRIA, 2005) o perfil de biomoléculas antifúngicas pode apresentar até seis picos, cuja eluição ocorre entre 15 e 30 minutos. Para Jag248 foram detectados 11 picos, que eluíram entre 4 e 18 minutos (Figura 25 B, página 84). Estes resultados refletem que dentro de uma mesma família de lipopeptídeos pode ocorrer uma variedade de isoformas que, reunidas, caracterizam um sistema de biomoléculas com propriedades particulares. Podem ser biossurfactantes como as isoformas apresentadas no perfil da surfactina ou antifúngicos, como o da iturina. Mesmo que o cromatograma de Jag248 não tenha sido conclusivo, o sistema de biomoléculas formado por essa bactéria revela-se, no mínimo, interessante, visto que apresenta simultaneamente propriedades antifúngicas e tensoativas. As comparações realizadas com o perfil cromatográfico de RB14, especificamente, reforçam a suspeita de que iturina seja um dos lipopeptídeos principais no sistema apresentado por *Bacillus* sp. Jag248. Entretanto, a dupla atividade no mesmo sistema pode sugerir ainda tratar-se de uma nova família de biomoléculas.

Outra importante evidência verificada na análise em HPLC foi a degradação de parte da molécula pelo calor, conforme visualizamos na Figura 25 B (página 84, cromatograma em preto). Entretanto, a quantidade que permaneceu na amostra analisada

ainda foi bastante eficiente no que se refere à atividade tensoativa, fato confirmado nos ensaios posteriores de espalhamento de óleo (Figura 26 B, página 85). Certamente, esta eficiência decorre dos baixos valores de CMC sugeridos para o sistema de biossurfactantes de Jag248.

Como *Bacillus* sp. Jag248 foi positivo para o gene da iturina (Figura 9, página 70) e foi capaz de inibir o crescimento dos fungos testados (Figura 10, página 70), realizamos um ensaio paralelo com o sobrenadante não tratado e após a pré-purificação, a fim de avaliar se as atividades de espalhamento de óleo e antifúngica ocorriam nas mesmas condições. Os resultados mostraram que o sobrenadante bruto de *Bacillus* sp. Jag248 não inibiu o crescimento dos fungos testados, mas a fração pré-purificada com acetato de etila sim (Figura 27, página 86). Essa diferença de resultados pode ser explicada possivelmente devido à baixa concentração do produto no sobrenadante não tratado. A detecção de atividade positiva do sistema dessas biomoléculas depois da caracterização parcial confirmou essa hipótese (Figura 27, página 86). Ainda em relação ao resultado do experimento de pré-purificação, tivemos que as células lisadas não inibiram o crescimento de *Aspergillus niger* (Figura 27 A, página 86). Esta informação fortaleceu a suspeita de que o produto pesquisado era liberado no meio de cultura, quando do crescimento de Jag248 em meio líquido.

Apesar dos resultados interessantes obtidos neste trabalho no que se refere à produção de tensoativos e antifúngicos por *Bacillus* sp. Jag248, é importante destacar que a condição ótima para síntese dessas biomoléculas por essa bactéria não foi ainda determinada. É possível que, modificando algumas características do meio, como a concentração de alguns nutrientes, em especial Fe e N, e das condições de cultivo, como temperatura e aeração, obtenhamos melhores resultados. Vale lembrar que esta cultura produziu muita espuma ao longo da fermentação e que esta atua como interferente, comprometendo a produção de biossurfactantes a níveis máximos. Em sistema fechado, parte do surfactante tende a ficar aprisionado na espuma aderida às paredes do reator (DAVIS, LYNCH & VARLEY, 2001).

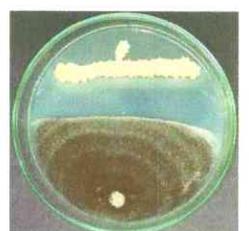
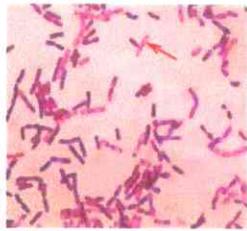
A análise geral dos resultados obtidos, nos permite inferir que a substância tensoativa produzida pela cepa *Bacillus* sp. Jag248 seja realmente um lipopeptídeo do tipo

iturina. Vários são os motivos que fortalecem essa idéia. Inicialmente, o micro-organismo em questão não apresentou o gene para surfactina, apenas para iturina. Em segundo, a produção do biossurfactante foi máxima na fase final do crescimento (Figura 18 A, página 78). Em geral, dentre diversas espécies de *Bacillus*, os lipopeptídeos são produzidos em diferentes fases do crescimento celular. Na transição da fase exponencial para a fase estacionária ocorre a síntese principalmente de surfactinas, no início da fase estacionária, de fengicina e ao fim da curva de crescimento, ocorre o acúmulo de iturina (ONGENA & JACQUES, 2008). Em terceiro, observamos uma incompatibilidade entre o perfil cromatográfico da molécula estudada e da surfactina (Figura 25 A, página 84). E ainda, o fato de *Bacillus* sp. Jag248 ter apresentado uma excelente atividade contra fungos com diferentes constituição de parede celular. Este resultado, especificamente, eliminou a possibilidade dessa inibição ser provocada por ação enzimática, reforçando a ação de um provável sistema de biomoléculas do tipo iturina. A atividade antifúngica foi visualizada após o cultivo pareado dessa bactéria com cinco linhagens de fungos e também foi detectada na forma pré-purificada do sobrenadante da cultura com acetato de etila (Figura 27, página 86), fração que também demonstrou máxima atividade de espalhamento do óleo (Figura 26, página 85).

Os resultados neste trabalho trazem contribuições importantes para a pesquisa de biossurfactantes no Brasil. A seleção de 15 linhagens microbianas produtoras de biossurfactantes, bioemulsificantes e compostos antifúngicos oriundas de solos de manguezal demonstra o valor desse ecossistema para garimpagem de organismos e/ou genes de valor biotecnológico.

# Conclusões

---



## 7. CONCLUSÕES

Ao finalizarmos este trabalho, pudemos responder aos objetivos propostos concluindo que:

Os solos de manguezais representam ricas fontes de micro-organismos produtores de tensoativos, os quais podem pertencer a classes conhecidas ou novas classes dessas biomoléculas. A estratégia de aquecimento prévio do solo foi bastante efetiva para selecionar espécies de bactérias produtoras de esporos e de tensoativos. Os micro-organismos selecionados foram identificados através da sequência do gene da subunidade 16S do RNA ribossomal e apresentaram similaridade exclusiva com linhagens de *Bacillus* depositadas nas bases de dados.

As técnicas de espalhamento de óleo e de índice de emulsificação foram eficazes para selecionar, respectivamente, linhagens produtoras de biossurfactantes e emulsificantes, dentre 100 isolados bacterianos avaliados neste estudo. Quinze se destacaram como promissores para a síntese desses compostos.

A pesquisa de genes envolvidos com a síntese de surfactina e iturina permitiu a identificação de isolados produtores dessas biomoléculas. Interessantemente, além de atividades tensoativas, alguns lipopeptídeos também demonstraram atividade antifúngica, o que sugere o envolvimento biomoléculas em interações ecológicas em seus habitats naturais.

Um dos isolados identificado como *Bacillus* sp. Jag248 se mostrou promissor para ser explorado com vistas à produção em larga escala de substâncias antifúngica, biossurfactante e desemulsificante. A síntese de emulsificantes e tensoativos por esta cepa ocorreu de forma independente, em diferentes momentos de crescimento da cultura, o que facilita futuramente a produção em larga escala e minimiza os custos finais de recuperação desses produtos.

O sistema de biomoléculas produzido por *Bacillus* sp. Jag248 foi resistente ao aquecimento a 121°C por 1 hora e apresentou excelente atividade em pH 7,0, independente de ter sido submetido a variações de pH bruscas. Além disso, os produtos dessa cepa foram

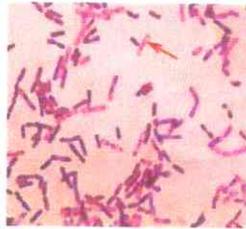
melhores para remoção de petróleo de água do mar que os surfactantes químicos e puderam alterar a viscosidade do petróleo. Essas propriedades reunidas fazem desta cepa uma forte candidata para testes em MEOR.

A fração pré-purificada em acetato de etila do sobrenadante de Jag248 apresentou simultaneamente as atividades de espalhamento de óleo e de inibição de fungos, sugerindo tratar-se de um novo sistema de tensoativos, sendo que essas propriedades para um mesmo sistema de tensoativos não se encontram relatadas na literatura.

Embora o rendimento não tenha sido determinado nesse estudo, todas as atividades observadas no sistema de biomoléculas produzidas por Jag248 foram detectadas em preparações brutas ou parcialmente purificadas. Isso serve para ressaltar o potencial dessa linhagem, visto que seus produtos podem ser usados sem posterior tratamento, o que significa economia do processo.

# Perspectivas Futuras

---



## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Identificar o sistema de biomoléculas via HPLC/MS (do inglês: “*High-Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*” ou cromatografia líquida de alto desempenho acoplada à espectrometria de massa).
- Estabelecer, por metodologia de superfície de resposta, as melhores condições de crescimento e produção de biossurfactantes por *Bacillus* sp. Jag248.
- Pesquisar substratos alternativos, de baixo custo, que possam ser utilizados na síntese de biossurfactantes pela linhagem Jag248.
- Avaliar o efeito da adição do biossurfactante estudado na velocidade de biodegradação de hidrocarbonetos em solo e água marinha, e na estrutura das comunidades microbianas nativas.
- Estudar a aplicação do biossurfactante na mobilização do petróleo em rochas e seus efeitos na viscosidade do óleo.
- Verificar a possível produção dos biossurfactantes por células de *Bacillus* sp. Jag248 quando imobilizadas em quitosana.
- Aprofundar os estudos sobre a relação surfactante e atividade antifúngica.

# Referências Bibliográficas

---



## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSHAR, S.; LOTFABAD, T. B.; ROOSTAAZAD, R.; NAJAFABADI, A.R.; NOGHABI, K.A. Comparative approach for detection of biosurfactant-producing bacteria isolated from Ahvaz petroleum excavation areas in south of Iran. **Annals of Microbiology**, v.58 (3), p.555-560, 2008.

AHIMOU, F.; JACQUES, P.; DELEU, M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. **Enzyme and Microbial Technology**, v.27, p.749-754, 2000.

ALONGI, D. M. Bacterial productivity and microbial biomasses tropical mangrove sediments. **Microbial Ecology**, v.15, p.59-79, 1988.

ARAÚJO, F.F.; HENNING, A.A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1639-1645, 2005.

ARIMA, K., KAKINUMA, A., TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemichal and Biophysical Research Communications**, v. 31, p.488-494, 1968.

ATLAS, R. M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v.31(4-12), p.178-182, 1995.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.495-508, 2000.

BANAT, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial-enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A Review. **Bioresource Technology**, v.51, p.1-12, 1995.

BANAT, I.M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants: production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.87, p.427-444, 2010.

BANO, N.; NISA, M. U.; KHAN, N.; SALEEM, M.; HARRISON, P. J.; AHMED, S. I.; AZAM, F. Significance of bacteria in the flux of organic matter in the tidal creeks of the mangrove ecosystem of the Indusriver delta, Pakistan. **Marine Ecology Progress Service**, v.157, p.1-12, 1997.

BAPTIST, J. N.; MANDEL, M.; GHERNA, R. L. Comparative zone electrophoresis of enzymes in the genus *Bacillus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.28, p.229-244, 1978.

BARRETO, R. V. G.; HISSA, D. C.; PAES, F. A.; GRANGEIRO, T. B.; NASCIMENTO, R. F.; REBELO, L. M.; CRAVEIRO, A. A.; MELO, V. V. M. New approach for petroleum hydrocarbon degradation using bacterial spores entrapped in chitosan beads. **Bioresource Technology**, v.101, p.2121-2125, 2010.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; PASTORE, G.M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28(4), p.979-985, 2008.

BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; GAYLARDE, C.C. Biossurfactantes. Em: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna-SP, p.151-178, 2008.

BISWAS H.; MUKHOPADHYAY S. K.; SEN S.; JANA T. K. Spatial and temporal patterns of methane dynamics in the tropical mangrove dominated estuary, NE coast of Bay of Bengal. **India Journal of Marine Systems**, v.68, p.55-64, 2007.

BODOUR, A.A.; MILLER-MAIER, R.M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v.32, p.273-280, 1998.

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

BONMATIN, J.M.; LAPRÉVOTE, O.; PEYPOUX, F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v.6, p.541-556, 2003.

BOSCH, R.; AXCELL, E. Produced-water chemical treatments enable environmental compliance. **World Oil**, v.226(10), p.75-80, 2005.

BOSCH, M.P. Surface active compounds on microbial cultures. **Tenside Surfactants Detergents**, v.25, p.208-211, 1988.

BOUILLON S.; MOENS T.; KOEDAM N.; GUEBAS F. D.; BAEYENS W.; DEHAIRS F. Variability in the origin of carbon substrates for bacterial communities in mangrove sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, v.49, p.171-179, 2004.

BRADDOCK, J. F.; LINDSTROM, J. E.; YEAGER, T. R.; RASLEY, B. T.; BROWN, E. J. Patterns of microbial activity in oiled and unoled sediments in Prince William Sound EXXON VALDEZ. **Proceedings of the Exxon Valdez oil spill symposium**. Bethesda: American Fisheries Society, v.18, p.94-108, 1996.

BRITO, E. M. S.; GUYONEAUD R.; URRIZA M. G.; PEYRUSE A. R.; VERBAERE, MIRIAM A.; CRAPEZ A. C.; WASSERMAN J. C.; DURAN R. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. **Research in Microbiology**, v. 157, p.752-762, 2006.

CAMEOTRA S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v.7, p. 262-266, 2004.

CARRILLO, P.G.; MARDARAZ, C.; PITTA-ALVAREZ, S.I.; GIULIETT, A. M. Isolation and selection of biosurfactant producing bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.12, p.82-84, 1996.

COOPER, D.G. Biosurfactants. **Microbiology Science**, v.3(5), p.145-149, 1986.

COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.224-229, 1987.

COOPER, D.G.; MACDONALD, C.R.; DUFF, S.J.B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.42, p.408-412, 1981.

COOPER, D.G.; ZAJIC, J.E. Surface active compounds from microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v.26, p.229-253, 1980.

CORRER, C. J.; MAZZOCHIN, L. F.; LOBO, I.; SAAB, O.J.G.A.; GUEDES, C.L.B. Aplicação “in situ” de surfactantes em solo contaminado com petróleo e tratamento da água residual com agente oxidante. **Anais do 4º PDPETRO**, Campinas, SP, 21-24 de Outubro de 2007.

CRAPEZ, M.A.C.; BORGES, A.L.N.; BISPO, M.G.S.; PEREIRA, D.C. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, v.30 (179), p.32-37, 2002.

CURY, J. C.; TORRADO, P. V.; LAMBAIS, M. R. Impacto da poluição por petróleo na diversidade genética e funcional da microbiota de solos de mangue. **Anais do Simpósio de Química e Meio Ambiente** v. 1, p.29, 2002.

DANIEL, R. The soil metagenome – a rich resource for the discovery of novel natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, p.199-204, 2004.

DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Differential utilization of pyrene as the sole source of carbon by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains: role of biosurfactants in enhancing bioavailability. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p.195-203, 2007.

DAS, M. Characterization of de-emulsification capabilities of a *Micrococcus* species. **Bioresource Technology**, v.79, p.15-22, 2001.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.1675-1684, 2008.

DAVIS, D.A.; LYNCH, H.C.; VARLEY, J. The application of foaming for the recovery of surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p.346-354, 2001.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.61, p.47-64, 1997.

DESHPANDE, S.; SHIAU, B.J.; WADE, D.; SABATINI, D.A.; HARWELL, J.H. Surfactant selection for enhancing *ex situ* soil washing. **Water Research**, v.33, p.351-360, 1999.

DIAS, A. C. F. **Diversidade de bactérias do sedimento de manguezal da Ilha do Cardoso-Cananéia – São Paulo**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantã/IPT - Universidade de São Paulo, São Paulo, 61p., 2008.

DIAS, A. C. F.; ANDREOTE, F. D.; DINI-ANDREOTE, F.; LACAVA, P. T.; SÁ, A. L. B.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.25, p.1305-1311, 2009.

du NOÛY, P.L. An interfacial tensiometer for universal use. **The Journal of General Physiology**, v.7, p.625-633, 1925.

DUITMAN, E. H., L. W. HAMOEN, M. REMBOLD, G. VENEMA, H. SEITZ, W. SAENGER, F. BERNHARD, R. REINHARDT, M. SCHMIDT, C. ULLRICH, T. STEIN, F. LEENDERS, AND J. VATER. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, p13294-13299, 1999.

EICHLER, J. Biotechnological uses of archaeal extremozymes. **Biotechnology Advances**, v.19, p.261-278, 2001.

ENCINAS, J. P.; SANZ-GOMES, J.; GARCIA-LOPEZ, M. L.; GARCIA-ARMESTO, M. R.; OTERO, A. Evaluation of different systems for identification of *Bacillus* strains isolated from Spanish fermented sausages. **Meat Science**, v.42, p.127-131, 1996.

FERREIRA, T.O.; VIDAL-TORRADO, P.OTERO, X.L.; MACÍAS, F. Are mangrove forest substrates sediments or soils? A case study in southeastern Brazil. **Catena**, v.70, p.79-91, 2007.

FOLK R.L., WARD W.C. Brazos river bar: a study of significant of grain size parameters. **Journal of Sedimentary Petrology**, v.27, p.3-26, 1957.

FREITAS, D.B.; REIS, M.P.; LIMA-BITTENCOURT, C.I.; COSTA, P.S.; ASSIS, P.S.; SOUZA, E.C.; NASCIMENTO, A.M.A. Genotypic and phenotypic diversity of *Bacillus* spp. isolated from steel plant waste. **BMC Research Notes**, v.1(92), p.1-11, 2008.

GAYLARDE, C.C.; BELLINASSO, M.L.; MANFIO, G.P. Biorremediação.(orgs). **Biociencia e meio ambiente**. MG: Universidade Federal de Viçosa, 2005.

GORDON, R.E.; HAYNES, W.C.; PANG, C.H. **The genus *Bacillus***. Agriculture Handbook no. 427. Washington, DC: US Government Printing Office. 1973.

GOUVEIA, E. R.; LIMA, D. P. A.; DUARTE, M. S.; LIMA, G. M. S.; ARAUJO, J. M. Bactérias produtoras de biossurfactantes. **Biociencia Ciência e Desenvolvimento**, v.30, p.39-45, 2003.

HADDAD, N.I.A.; WANG, J.; MU, B.Z. Isolation and characterization of a biosurfactant producing strain, *Brevibacillus brevis* HOB1. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.1597-1604, 2008.

HAFERBURG, D.; HOMMEL, R.; CLAUS, R.; KLEBER, H.P. Extracellular microbial lipids as biosurfactants. **Advances in Biochemistry and Engineering Biotechnology**, v.33, p.54-93, 1986.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STANLEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1994, 787p.

HONG, H.A.; KHANEJA, R.; TAM, N.M.K.; CAZZATO, A.; TAN, S.; URDACI, M.; BRISSON, A.; GASBARRINI, A.; BARNES, I.; SIMON M. Cutting *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. **Research Microbiology**, v.160, p.134-143, 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.

HUANG, C. C., ANO, T.; SHODA, M. Nucleotide sequence and characteristics of the gene, *lpa-14*, responsible for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis* RB14. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 76, p.445-450, 1993.

HUSZCZA, E.; BURCZYK, B. Surfactin isoforms from *Bacillus coagulans*. *Z. Naturforschung*, v.61, p.727-733, 2006.

IQBAL, S.; KHALID, Z.M.; MALIK, K.A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyper production of biosurfactants by gamma ray-induced mutant *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, p.176-179, 1995.

IWAMOTO, T.; NASU, M. Current bioremediation practice and perspective. **Journal of Bioscience and Bioengineering** v. 92, p.1-8, 2001.

JACQUES, P.; HBID, C.; DESTAIN, J.; RAZAFINDRALAMBO, H.; PAQUOT, M.; PAUW, E.; THONART, P. Optimization of biosurfactant lipopeptide production

from *Bacillus subtilis*S499 by Plackett-Burman design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.77(1-3), p.223-233, 1999.

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

KALINOVSKAYA, N.I.; KUZNETSOVA, T.A.; IVANOVA, E.P.; ROMANENKO, L.A.; VOINOV, V.G.; HUTH, F.; LAATSCH, H. Characterization of surfactin-like cyclic depsipeptides synthesized by *Bacillus pumilus* from ascidian *Halocynthia aurantium*. **Marine Biotechnology**, v.4, p.179-188, 2002.

KANEDA, T. Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. **Bacteriological Reviews**, v.41, p.391-418, 1977.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B. L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. **Advances in Marine Biology**, v.40, p. 81-251, 2001.

KIM, K.M.; LEE, J.Y.; KIM, C.K.; KANG, J.S. Isolation and characterization of surfactin produced by *Bacillus polyfermenticus* KJS-2. **Archives of Pharmacal Research**, v.32, p.711-715, 2009.

KIM, P.I.; BAI, H.; BAI, D.; CHAE, H.; CHUNG, S.; KIM, Y.; PARK, R.; CHI, Y.T. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p. 942-949, 2004.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure and Applied Chemistry**, v.64, p.1731-1737,1992.

KOUMOUTSI, A.; CHEN, X.H.; HENNE, A.; LIESEGANG, H.; HITZEROTH, G.; FRANKE, P.; VATER, J.; BORRISS, R. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. **Journal of Bacteriology**, v.186, p.1084-1096, 2004.

LACERDA, L. D.; VAISMAN, A. G.; MAIA, L. P.; SILVA, C. A. R.; CUNHA, E. M. S. Relative importance of nitrogen and phosphorus emissions from shrimp farming and other anthropogenic sources for six estuaries along the NE Brazilian coast. **Aquaculture**, v. 253, p.433-446, 2006.

LALUMERA G. M.; CALAMARI D.; GALLI P.; CASTIGLIONI S.; CROSA G.; FANELLI R. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. **Chemosphere**, v.54, p.661-668, 2004.

LE T. X.; MUNEKAGE Y.; KATO S. Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas. **Science of the Total Environment**, v.349, p.95-105, 2005.

LEE, S.C.; LEE, S.J.; KIM, S.H.; PARK, I.H.; LEE, Y.S.; CHUNG, S.Y.; CHOI, Y.L. Characterization of new biosurfactant produced by *Klebsiella* sp. Y6-1 isolated from waste soybean oil. **Bioresource Technology**, v.99(7), p.2288-2292, 2008.

LIMA, L.B. **Produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de solos do manguezal do Jaguaribe, Ceará**. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 70p., 2010.

LIU, Z.F.; ZENG, G.M.; ZHONG, H.; FU, H.Y.; LIU, X.L. Production and characterization of biosurfactant from *Bacillus subtilis* CCTCC AB93108. **Journal of Central South University of Technology**, v.17(3), p.516-521, 2010.

LO, C. L.; HUANG, C. K.; LIN, K. M.; HSIUE, G. H. Mixed micelles formed from graft and diblock copolymers for application in intracellular drug delivery. **Biomaterials**, v.28, p.1225-1235, 2007.

LOPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; LOSICK, R.; KOLTER R. Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v.74, p.609-618, 2009.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. 2010. **Microbiologia de Brock**. Prentice Hall, São Paulo - SP. 1160p. 12<sup>a</sup> edição.

MAIA, LUIS P.; LACERDA, LUIZ D. ; MONTEIRO, LEONARDO H. U. ; SOUSA, GUILHERME M. **Estudos das áreas de manguezais do nordeste do Brasil, avaliação das áreas de manguezais dos Estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco.** UFC / ISME-BR / ABCC, 62p., Fortaleza, 2005. (Disponível em <http://www.abccam.com.br>. Acesso em abril de 2011).

MAIA, L. P.; LIMA, J. P. R. Hydrogeochemistry of groundwater saline intrusion in Ceará, NE Brazil. In: L.D. Lacerda; R.E. Santelli; E. Duursma; J. Abrao. **Environmental Geochemistry in Tropical and Sub-tropical Environments.** Springer, Berlin, p.277-292, 2004.

MAIER, R.M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. **Advances and Applied Microbiology**, v.52, p.101-121, 2003.

MANEERAT, S.; PHETRONG, K. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfact. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. v.29(3) p.781-791, 2007.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v.24(1), p.87-93, 2001.

MERCADÉ, M.E.; DE ANDRES, M.C.; RONDON, I.; MARTINEZ, F.; ESPUNY, M.J.; MANRESA, M.A. Screening and selection of surfactants producing bacteria from waste lubricating oil. **Journal of Applied Bacteriology**, v.81, p.161-166, 1996.

MILLS, D. K.; FITZGERALD, K.; LITCHFIELD, C. D.; GILLEVET, P. M. A comparison of DNA profiling techniques for monitoring nutrient impact on microbial community composition during bioremediation of petroleum-contaminated soils. **Journal of Microbiological Methods**, v. 54, p.57-74, 2003.

MIRANDA, C. A.; MARTINS, O. B.; CLEMENTINO, M. M. Species-level identification of *Bacillus* strains isolates from marine sediments by conventional biochemical, 16S rRNA gene sequencing and inter-tRNA gene sequence lengths analysis. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.93, p.297-304, 2008.

- MIZUMOTO, S.; HIRAI, M.; SHODA, M. Enhanced iturin A production by *Bacillus subtilis* and its effect on suppression of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, p.1267-1274, 2007.
- MORÁN, A.C.; OLIVEIRA, N.; COMMENDATORE, M.; ESTEVES, J.L.; SINERIZ, F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. **Biodegradation**, v.11(1), p.65-71, 2000.
- MORAES, S.L.; REZENDE, M.O.O. Determinação da concentração micelar crítica de ácidos húmicos por medidas de condutividade e espectroscopia. **Química Nova**, v.27(5), p.701-705, 2004.
- 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.
- MORIKAWA, M.; ITO, M.; IMANAKA, T. Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-1, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, *psf-1*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.74, p.255-261, 1992.
- MUKHERJEE, A.K. Potential application of cyclic lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains in laundry detergent formulations. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p.330-335, 2007.
- MUKHERJEE, A.K.; DAS, K. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. **FEMS Microbiology Ecology**, v.54, p.479-489, 2005.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends Biotechnology**, v.24, p.509-515, 2006.
- MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v.133(2), p.183-198, 2005.

- NADARAJAH N, SINGH A, WARD, O.P. Evaluation of a mixed bacterial culture for de-emulsification of water-in-petroleum oil emulsions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, p.435-440, 2002.
- NAVON-VENEZIA, S.; ZOSIM, Z.; GOTTLIEB, A.; LEGMANN, R.; CARMELI, S.; NEU, T. R. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. **Microbiological reviews**, v.60(1), p.151-166, 1996.
- NIHORIMBERE, V.; FICKERS, P.; THONART, P.; ONGENA, M. Ecological fitness of *Bacillus subtilis* BGS3 regarding production of the surfactin lipopeptide in the rhizosphere. **Environmental Microbiology Reports**, v.1(2), p.124-130, 2009.
- NITSCHKE, M. **Produção e caracterização de biossurfactante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato**. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) - Universidade Estadual de Campinas-Campinas - São Paulo, 99p., 2004.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Quimica Nova**, v. 25(5), p.772-776, 2002.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v.97(2), p.336-341, 2006.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Cassava Flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.106, p.295-302, 2003.
- NOGUEIRA, V.L.R. **Acesso à diversidade e função microbiana de sedimentos de manguezal por métodos dependentes de cultivo e metagenoma**. Trabalho em submissão. 2011.
- ONGENA, M., JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, v.16, p.115-125, 2008.

- ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J.-L.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of an induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, v.9, p.1084-1090, 2007.
- PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G.A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S.S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, p.633-654, 2011.
- PEERSON, A.; MOLIN, G. Capacity for biosurfactant production of environmental *Pseudomonas* and *Vibrionaceae* growing on carbohydrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.26, p.439-442, 1987.
- PEREIRA, R.C.; GOMES, A.S. **Biologia Marinha**. Editora Interciência, Rio de Janeiro - RJ, 363p., 2002.
- PEYPOUX, F.; BONMATIN, J.M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.51, p.553-563, 1999.
- PHAE, C.; SHODA, M. Investigation of optimal conditions for foam separation of iturin an antifungal peptide produced by *Bacillus subtilis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.71, p.118-121, 1991.
- PRICE, N.P.J.; ROONEY, A.P.; SWEZEY, J.L.; PERRY, E.; COHAN, F.M. Mass spectrometric analysis of lipopeptides from *Bacillus* strains isolated from diverse geographical locations. **FEMS Microbiology Letters**, v.271, p.83-89, 2007.
- PRIEST, F.G.; GOODFELLOW, M.; TODD, C. A numerical classification of the genus *Bacillus*. **Journal of General Microbiology**, v.134, p.1847-1882, 1988.
- PRIYA, T.; USHARANI, G.; Comparative study for biosurfactant production by using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Botany Research International**, v.2(4), p.284-287, 2009.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Production and properties of a biosurfactant synthesized by *Arthrobacter protophormiae* - an Antarctic stain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.13, p.133-135, 1997.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Effect of nutrients on optimal production of biosurfactants by *Pseudomonas putida* — A Gujarat oil field isolate. **Journal of Surfactants and Detergents**, v.6(1), p.65-68, 2003.

PUEYO, M.; BLOCH, C.; CARMONA-RIBEIRO, A.; DI MASCIO, P. Lipopeptides produced by a soil *Bacillus megaterium* strain. **Microbial Ecology**, v.57, p.367-378, 2009.

RAAIJMAKERS, J.M.; BRUJIN, I.; NYBROE, O.; ONGENA, M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v.34, p.1037-1062, 2010.

RAHMAN, K.S.M.; RAHMAN, T.J.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. The potential of bacterial isolates for emulsification with a range of hydrocarbons. **Acta Biotechnologica**, v.23(4), p.335-345, 2003.

RAHMAN, P. K. S. M.; GAKPE, E. Production, characterization and applications of biosurfactants. **Biotechnology**, v.7(2), p.360-370, 2008.

RODRIGUES, L.; BANAT, I.M.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Biosurfactants: potential applications in medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, p.609-618, 2006.

ROMERO, D.; VICENTE, A.; RAKOTOALY, R.H.; DUFOUR, S.E.; VEENING, J.-W.; ARREBOLA, E.; CAZORLA, F.M.; KUIPERS, O.P.; PAQUOT, M.; PÉREZ-GARCIA, A. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.20, p.430-440, 2007.

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

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.249-252, 2002.

ROSENBERG, E.; RON, E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52(2), p.154-162, 1999.

RUGGERI, C.; FRANZETTI, A.; BESTETTI, G.; CAREDDA, P.; LA COLLA, P.; PINTUS, M.; SERGI, S.; TAMBURINI, E. Isolation and characterization of surface active compound-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated environments by a high-throughput screening procedure. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.63, p.936-942, 2009.

SAENGER, P. **Mangrove Ecology, Silviculture and Conservation**. Kluwer Academic Publisher, U. S. A., 2002.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**. v.4, p.406-425, 1987.

SATPUTE, S.K.; BANPURKAR, A.G.; DHAKEPHALKAR, P.K.; BANAT, I.M.; CHOPADE, B.A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, p.1-18, 2010.

SATPUTE, S.K.; BHAWSAR, B.D.; DHAKEPHALKAR, P.K.; CHOPADE, B.A. Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. **Indian Journal of Marine Science**, v.37(3), p.243-250, 2008.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Manguezal: ecossistema entre terra e o mar**. Caribbean Ecological Research, São Paulo, São Paulo, 62p, 1995.

SCHULTE, E. E.; HOPKINS, B.G. **Estimation of soil organic matter by weight loss-on-ignition**. In: MAGDOFF, F. R.; TABATABAI, M.A.; HANLON Jr., E. A. Soil organic matter: Analysis and interpretation. Madison, p. 21-31, 1996.

SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.34, p.714-724, 2008.

SEN, R. Response surface optimization of the critical media components for the production of surfactin. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.68, p.263-270, 1997.

SENGUPTA, A.; CHAUDHURI, S. Ecology of heterotrophic dinitrogen fixation in the rhizosphere of mangrove plant community at the Ganges river estuary in India. **Oecologia**. v. 87, p.560-564, 1991.

SENGUPTA, A.; CHAUDHURI, S. Halotolerant *Rhizobium* strains from mangrove swamps of the Ganges River Delta. **Indian Journal Microbiology**, v.30, p.483-484, 1990.

SESSISTSCH, A.; WEILHARTER, A.; GERZABEK, M. H.; KIRCHMANN, H.; KANDELER, E. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67(9), p.4215-4224, 2001.

SHEPPARD, J. D.; MULLIGAN, C. N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.27(2), p.110-116, 1987.

SHEPPARD, J., C. JUMARIE, D. COOPER, AND R. LAPRADE. Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1064, p.13-23, 1991.

SHIRAKAWA, M. A.; JONH, V. N.; CINCOTTO, M. A.; GAMBALE, V. **Contaminação da água subterrânea por hidrocarbonetos de petróleo e consequentemente biodeterioração de concreto projetado em túnel**. In: \_\_\_\_\_ **Biodegradação: Contribuição do II Workshop sobre Biodegradação**. Campinas, SP, Brasil 13-20 de junho, Empraba Meio Ambiente, 2001.

SHOME, R.; SHOME, B.R.; MANDAL, A.B.; BANDOPADHYAY, A.K. Bacterial flora in mangroves of Andaman. Part 1: Isolation, identification and antibiogram studies. **Indian Journal of Marine Sciences**, v.24, p.97-98, 1995.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v.25, p.99-121, 2007.

SMITH, N. R.; GORDON, R. E.; CLARK, F. E. (1952). **Aerobic Spore-forming Bacteria. Agriculture**. Monograph n°16. Washington DC: United States Department of Agriculture.

SNOOK, M.E.; MITCHELL, T.; HINTON, D.M.; BACON, C.W. Isolation and characterization of Leu7-surfactin from the endophytic bacterium *Bacillus mojavenis* RRC 101, a biocontrol agent for *Fusarium verticillioides*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.4287-4292, 2009.

SOUTO, G.I.; CORREA, O.S.; MONTECCHIA, M.S.; KERBER, N.L.; PUCHEU, N.L.; BACHUR, M.; GARCIA, A.F. Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.1247-1256, 2004.

STACKEBRANDT, E.; LUDWIG, W.; WEIZENEGGER, M.; DORN, S.; MCGILL, T.J.; FOX, E.G.; WOESE, C.R.; SCHUBERT, W.; SCHLEIFER, K.H. Comparative 16S rRNA oligonucleotide analyses and murein types of round-spore-forming bacilli and non-spore-forming relatives. **Journal of General Microbiology**, v.133, p.2523-2529, 1987.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v.56, p.845-857, 2005.

SUGUIO, K. **Introdução à sedimentologia**. Editora Edgard Blucher, EDUSP, São Paulo, 317 p., 1973.

SUTHAR, H.; HINGURAO, K.; DESAI, A.; NERURKAR, A. Evaluation of bioemulsifier mediated microbial enhanced oil recovery using sand pack column. **Journal of Microbial Methods**, v.75, p.225-230, 2008.

TANIYAVARN, J.; ROONGSAWANG, N.; KAMEYAMA, T.; HARUKI, M.; IMANAKA, T.; MORIKAWA, M.; KANAYA, S. Production and characterization of biosurfactants from *Bacillus licheniformis* F2.2. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.67, p.1239-1244, 2003.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; BANAT, I.M. Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.917-925, 2008.

TOMLINSON, P. B. The botany of mangroves. **Cambridge tropical biology series**. Cambridge University Press, 423 p., 1994.

TRISCHMAN, J.A.; JENSEN, P.R.; FENICAL, W. Halobacillin: a cytotoxic cyclic acylpeptide of the iturin class produced by a marine *Bacillus*. **Tetrahedron Letters**, v.35, p.5571-5574, 1994.

TSUGE, K.; AKIYAMA, T.; SHODA, M. Cloning, sequencing, and characterization of the Iturin A operon. **Journal of Bacteriology**, v.183(21), p.6265-6273, 2001.

TSUGE, K.; ANO, T.; HIRAI, M.; NAKAMURA, Y.; SHODA, M. The genes degQ, pps, and *lpa-8* (*sfp*) are responsible for conversion of *Bacillus subtilis* 168 to plipastatina production. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, p.2183-2192, 1999.

TSUGE, K.; ANO, T.; SHODA, M. Isolation of a gene essential for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics plipastatin B1 and surfactin in *Bacillus subtilis* YB8. **Archives Microbiology**, v.165, p.243-251, 1996.

TSUGE, K.; INOUE, S.; ANO, T.; ITAYA, M.; SHODA, M. Horizontal transfer of Iturin A operon, *itu*, to *Bacillus subtilis* 168 and conversion into an iturin A producer. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49 (11), p.4641-4648, 2005.

- TYAGI, M.; FONSECA, M.M.R.; CARVALHO, C.C.C.R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation**, v.22(2), p.231-241, 2011.
- URUM, K.; PEKDEMIR, T.; COPUR, M. Surfactants treatment of oil contaminated soils. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.276, p.456-464, 2004.
- Van der VEGT, W.; Van der MEI, H.C.; NOORDMANS, J.; BUSSCHER, H.J. Assessment of bacterial biosurfactant production through axisymmetric drop shape analysis by profile. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.35(6), p.766-770, 1991.
- Van GESTEL, M.; MERCKX, R.; VLASSEK, K. Spatial distribution of microbial biomass in microaggregates of a silty-loam soil and the relation with the resistance of microorganisms to soil drying. **Soil Biology and Biochemistry**, v.28, p.503-510, 1996.
- VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Recent Advances in Petroleum Microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67(4), p.503-549, 2003.
- VAN HAMME, J.D.; URBAN J. Biosurfactants in bioremediation. **Advances in Applied Bioremediation**, Soil Biology, v.17, p.73-89, 2009.
- VATER, J.; KABLITZ, B.; WILDE, C.; FRANKE, P.; MEHTA, N.; CAMEOTRA, S.S. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.6210-6219, 2002.
- VAUX, D., COTTINGHAM, M. **Method and apparatus for measuring surface configuration**. Patent number WO 2007/039729 A1, 2001.
- VEIGA, I. G. **Avaliação da origem dos hidrocarbonetos em sedimentos superficiais de manguezais da região norte da baía de Todos os Santos/Bahia**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Exploração de Petróleo) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Macaé, Rio de Janeiro, 205 p., 2003.

VIRAMONTES-RAMOS, S.; PORTILLO-RUIZ, M. C.; BALLINAS-CASARRUBIAS, M. L.; TORRES-MUÑOZ, J. V.; RIVERA-CHAVIRA, B. E; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V. Selection of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from hydrocarbon contaminated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.668-675, 2010.

WALKER, D.; MICHEL, K.; COLEMAN, J.C.; MICHEL, J. 2003. "Oil in the sea: changes in the nature of sources and inputs since 1985". 2003 International Oil Spill Conference, British Columbia, Canadá, Abril 2003.

WARD, O.P.; SINGH, A.; VAN HAMME, J.D.; VOORDOUW, G. **Petroleum Microbiology**. Encyclopedia of Microbiology 3E (Elsevier), p.443-456, 2009.

WEI, Y-H.; CHU, I-M. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p.724-728, 1998.

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

WENTWORTH, C.K. A scale of grade and class terms for clastic sediments. **Journal of Geology**, v.30, p.377-392, 1922.

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(4), p.1329-1334, 2005.

YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E., NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; KNAPP, R. M.; MCLNERNEY, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactants production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v.56, p.339-347, 2004.

YU, G.Y.; SINCLAIR, J.B.; HARTMAN, G.L.; BERTAGNOLLI, B.L. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.34, p.955-963, 2002.

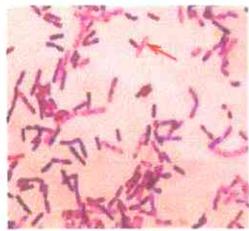
ZAKI, N.N. Surfactant stabilized crude oil-in-water emulsions for pipeline transportation of viscous crude oils. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.125, p.19-25, 1997.

ZHOU, H. W.; GUO, C. L.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Y. Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments. **FEMS Microbiology Letters**, v.262, p.148-157, 2006.

ZOBELL, C. T. The occurrence, effect and fate of oil polluting the sea. **Advances in Water Pollution Research**, v.3, p.85-118, 1964.

# Anexos

---



## 10. ANEXOS

**ANEXO A** - Resultados dos ensaios de atividade emulsificante (E24) com as 100 linhagens isoladas do solo do manguezal do Rio Jaguaribe. Em destaque, as bactérias que apresentaram os melhores valores.

Linagem	E24 1 (%)		E24 média 1	E24 Desvio padrão 1	E24 2 (%)		E24 média 2	E24 Desvio padrão 2	E24 média final	E24 Desvio padrão final
14	29,4	28,8	29,1	0,4	28,6	28,9	28,8	0,2	28,9	0,3
15	23,6	23,6	23,6	0,0	23,5	23,9	23,7	0,3	23,7	0,2
15B	16,8	16,2	16,5	0,4	10,4	10,2	10,3	0,1	13,4	3,6
16	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
18	13,7	13,6	13,7	0,1	16,7	17,1	16,9	0,3	15,3	1,9
19	22,5	22,3	22,4	0,1	20,9	20,3	20,6	0,4	21,5	1,1
112	32,3	30,2	31,3	1,5	35	33,7	34,4	0,9	32,8	2,1
114	15,2	15,4	15,3	0,1	15,8	16	15,9	0,1	15,6	0,4
115	23	23,5	23,3	0,4	23,5	23,5	23,5	0,0	23,4	0,3
117	12,5	12,3	12,4	0,1	11,5	12	11,8	0,4	12,1	0,4
118	20,1	20	20,1	0,1	20,1	19,8	20,0	0,2	20,0	0,1
122	28,2	28,2	28,2	0,0	28	27,8	27,9	0,1	28,1	0,2
123	24,3	24	24,2	0,2	24,5	25	24,8	0,4	24,5	0,4
124	18,3	18	18,2	0,2	20,2	19,5	19,9	0,5	19,0	1,0
125	26,8	26,5	26,7	0,2	27	27	27,0	0,0	26,8	0,2
126	23,5	22	22,8	1,1	24	25	24,5	0,7	23,6	1,3
127	28,5	29	28,8	0,4	31	30	30,5	0,7	29,6	1,1
129	16	17	16,5	0,7	17,8	18,3	18,1	0,4	17,3	1,0
130	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
134	25,6	26	25,8	0,3	26	27,2	26,6	0,8	26,2	0,7
137	21,5	20,8	21,2	0,5	21,8	21	21,4	0,6	21,3	0,5
142	17,9	18	18,0	0,1	19	17,8	18,4	0,8	18,2	0,6
145	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
154	21,6	20,2	20,9	1,0	22	21,8	21,9	0,1	21,4	0,8
171	10	9,7	9,9	0,2	11,2	10,4	10,8	0,6	10,3	0,7
173	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
174	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
182	32,8	33	48,0	0,1	31,5	30	30,8	1,1	39,4	1,4
183	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
184	17,8	16,5	17,2	0,9	17	17,8	17,4	0,6	17,3	0,6
185	57	57	57	0,0	57	57	57,0	0,0	57	0,0
191	45,2	39,5	42,4	4,0	46	41	43,5	3,5	42,9	3,2
195	15,5	14,8	15,2	0,5	15,3	15,8	15,6	0,4	15,4	0,4
198	48	48	48,0	0,0	48	48	48,0	0,0	48,0	0,0
1732	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0

21	15,3	15,8	15,6	0,4	16,3	15,8	16,1	0,4	15,8	0,4
27	21,7	21,9	21,8	0,1	21,5	21	21,3	0,4	21,5	0,4
29	29,2	28,5	28,9	0,5	28,6	28	28,3	0,4	28,6	0,5
212	45,4	42	43,7	2,4	43,7	44,7	44,2	0,7	44,0	1,5
212(2)	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
214	11,9	12,5	12,2	0,4	12	12,9	12,5	0,6	12,3	0,5
220	37,5	37,5	37,5	0,0	36,8	37,2	37,0	0,3	37,3	0,3
222	18,5	18	18,3	0,4	17,6	18	17,8	0,3	18,0	0,4
227	5	4,8	4,9	0,1	4,5	5,2	4,9	0,5	4,9	0,3
230	36,9	36,7	36,8	0,1	36,5	36,5	36,5	0,0	36,7	0,2
234	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
236	28,7	28,5	28,6	0,1	29,3	30,2	29,8	0,6	29,2	0,8
237	1,5	0	0,8	1,1	1,8	1,6	1,7	0,1	1,2	0,8
238	37,8	38,2	38,0	0,3	40,5	39	39,8	1,1	38,9	1,2
239	26	26,2	26,1	0,1	26	26,7	26,4	0,5	26,2	0,3
240	28,2	28,3	28,3	0,1	28,2	28	28,1	0,1	28,2	0,1
241	32,6	33	32,8	0,3	32,8	32,9	32,9	0,1	32,8	0,2
242	44,1	42,3	43,2	1,3	42,3	40,5	41,4	1,3	42,3	1,5
245	55,6	54	54,8	1,1	52,3	52,7	52,5	0,3	53,7	1,5
246	36,2	34	35,1	1,6	33,6	34	33,8	0,3	34,5	1,2
247	26	28,5	27,3	1,8	30	28	29,0	1,4	28,1	1,7
248	5	6,5	5,8	1,1	4,3	7	5,7	1,9	5,7	1,3
249	56	52,3	54,2	2,6	52,8	57,4	55,1	3,3	54,6	2,5
250	36,7	34,5	35,6	1,6	38	37,5	37,8	0,4	36,7	1,5
251	40,5	40,5	40,5	0,0	40,5	40,5	40,5	0,0	40,5	0,0
252	5,5	5,4	5,5	0,1	5,5	5,6	5,6	0,1	5,5	0,1
253	24,5	24,1	24,3	0,3	24,5	24,5	24,5	0,0	24,4	0,2
254	26	26,7	26,4	0,5	26	28	27,0	1,4	26,7	0,9
255	61,6	61,6	61,6	0,0	61,6	61,6	61,6	0,0	61,6	0,0
263	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
263,1	13	13	13,0	0,0	13	13	13,0	0,0	13,0	0,0
264	30,9	31,4	31,2	0,4	31	31,2	31,1	0,1	31,1	0,2
272	23,8	23,5	23,7	0,2	23,5	24	23,8	0,4	23,7	0,2
280	2,5	2,4	2,5	0,1	2,5	2,5	2,5	0,0	2,5	0,0
2102	5,4	5,5	5,5	0,1	5,5	5,5	5,5	0,0	5,5	0,0
31	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
32	33,2	32,7	33,0	0,4	31,4	33,2	32,3	1,3	32,6	0,9
32P	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
32E	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
33	18,4	19,2	18,8	0,6	17,5	17,7	17,6	0,1	18,2	0,8
34	24,1	23,8	24,0	0,2	23,4	23,8	23,6	0,3	23,8	0,3
35	32,8	33,5	33,2	0,5	33,2	33	33,1	0,1	33,1	0,3
37	24,8	24,2	24,5	0,4	33,2	33	33,1	0,1	28,8	5,0

<b>38</b>	27,2	28,5	27,9	0,9	29,7	28,9	29,3	0,6	28,6	1,0
<b>39</b>	19,2	19,7	19,5	0,4	20,1	19,8	20,0	0,2	19,7	0,4
<b>310</b>	41	41,7	41,4	0,5	42,1	40,5	41,3	1,1	41,3	0,7
<b>311</b>	33,5	33	33,3	0,4	31,8	32,7	32,3	0,6	32,8	0,7
<b>319</b>	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>321</b>	24,7	24,8	24,8	0,1	24,3	24,5	24,4	0,1	24,6	0,2
<b>322</b>	23	25	24,0	1,4	22,5	23	22,8	0,4	23,4	1,1
<b>324</b>	16,5	17	16,8	0,4	15,8	16	15,9	0,1	16,3	0,5
<b>325</b>	30,5	32,4	31,5	1,3	33,5	32,8	33,2	0,5	32,3	1,3
<b>327</b>	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>330</b>	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>331</b>	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>332</b>	21	25,8	23,4	3,4	22,5	23,5	23,0	0,7	23,2	2,0
<b>341</b>	29	28,5	28,8	0,4	28,7	29	28,9	0,2	28,8	0,2
<b>346</b>	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>346,1</b>	5	5,2	5,1	0,1	5,1	5,1	5,1	0,0	5,1	0,1
<b>346,2</b>	8	8	8,0	0,0	8,1	8	8,1	0,1	8,0	0,0
<b>358</b>	28,5	26,9	27,7	1,1	29,5	27,9	28,7	1,1	28,2	1,1
<b>360</b>	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>3100</b>	21,6	21	21,3	0,4	21,3	21	21,2	0,2	21,2	0,3
<b>3103</b>	6,6	6,7	6,7	0,1	6,5	6,5	6,5	0,0	6,6	0,1
<b>3104</b>	9,5	9	9,3	0,4	9,1	9,3	6,5	0,1	7,9	0,2

ANEXO B - Resultados dos ensaios de tensão superficial (TS) com as 100 linhagens isoladas do solo do manguezal do Rio Jaguaribe. Em destaque, as bactérias que apresentaram os melhores valores.

Linhagem	TS 1		TS média 1	TS Desvio padrão 1	TS 2		TS média 2	TS Desvio padrão 2	TS média final	TS Desvio final
14	55,3	55,0	55,2	0,2	55,2	55,0	55,1	0,1	55,1	0,1
15	56,5	56,5	56,5	0,0	54,0	53,0	53,5	0,7	55,0	1,8
15B	43,0	43,0	43,0	0,0	40,0	41,0	40,5	0,7	41,8	1,5
16	43,0	43,0	43,0	0,0	43,0	43,0	43,0	0,0	43,0	0,0
18	51,0	51,0	51,0	0,0	51,5	51,0	51,3	0,4	51,1	0,3
19	51,5	51,3	51,4	0,1	54,0	54,2	54,1	0,1	52,8	1,6
112	50,0	50,5	50,3	0,4	49,7	50,4	50,1	0,5	50,2	0,4
114	58,0	57,5	57,8	0,4	57,0	57,5	57,3	0,4	57,5	0,4
115	55,0	54,0	54,5	0,7	54,5	55,0	54,8	0,4	54,6	0,5
117	57,0	57,3	57,2	0,2	58,0	59,0	58,5	0,7	57,8	0,9
118	43,0	44,0	43,5	0,7	47,0	47,0	47,0	0,0	45,3	2,1
122	51,5	50,8	51,2	0,5	51,8	52,3	52,1	0,4	51,6	0,6
123	57,0	56,8	56,9	0,1	57,7	57,3	57,5	0,3	57,2	0,4
124	58,9	58,7	58,8	0,1	58,9	58,8	58,9	0,1	58,8	0,1
125	55,0	54,6	54,8	0,3	55,8	54,7	55,3	0,8	55,0	0,5
126	46,9	47,0	47,0	0,1	47,2	48,0	47,6	0,6	47,3	0,5
127	56,5	56,3	56,4	0,1	57,0	56,8	56,9	0,1	56,7	0,3
129	55,6	55,9	55,8	0,2	56,8	57,6	57,2	0,6	56,5	0,9
130	49,0	49,0	49,0	0,0	47,0	47,7	47,4	0,5	48,2	1,0
134	55,0	54,4	54,7	0,4	51,9	51,5	51,7	0,3	53,2	1,8
137	56,4	56,0	56,2	0,3	57,3	56,9	57,1	0,3	56,7	0,6
142	58,3	57,9	57,6	0,6	58,4	58,2	58,2	0,2	57,9	0,2
145	57,2	58,0	57,7	0,4	58,0	58,3	56,4	0,1	57,1	0,5
154	58,0	57,4	59,1	0,1	56,3	56,5	59,0	0,1	59,0	0,8
171	59,0	59,2	59,1	0,1	59,0	58,9	59,0	0,1	59,0	0,1
173	52,0	53,0	52,5	0,7	59,0	58,5	58,8	0,4	55,6	3,6
174	48,0	46,9	47,5	0,8	49,1	48,6	48,9	0,4	48,2	0,9
182	53,8	52,6	53,2	0,8	54,7	55,4	55,1	0,5	54,1	1,2
183	57,0	57,4	57,2	0,3	58,0	57,7	57,9	0,2	57,5	0,4
184	58,7	58,3	58,5	0,3	58,6	58,9	58,8	0,2	58,6	0,3
185	46,0	46,0	46,0	0,0	46,0	46,0	46,0	0,0	46,0	0,0
191	51,7	52,0	51,9	0,2	50,2	51,5	50,9	0,9	51,4	0,8
195	49,0	49,0	49,0	0,0	49,0	49,0	49,0	0,0	49,0	0,0
198	49,0	49,5	49,3	0,4	50,0	49,7	49,9	0,2	49,6	0,4
1732	30,0	30,0	30,0	0,0	30,0	30,0	30,0	0,0	30,0	0,0
21	53,6	54,0	53,8	0,3	55,2	54,8	55,0	0,3	54,4	0,7
27	55,7	56,8	56,3	0,8	57,2	56,3	56,8	0,6	56,5	0,6
29	54,0	54,5	54,3	0,4	55,3	54,9	55,1	0,3	54,7	0,6

<b>212</b>	51,6	52,0	51,8	0,3	52,7	52,5	52,6	0,1	52,2	0,5
<b>212(2)</b>	54,0	53,8	53,9	0,1	49,0	48,2	48,6	0,6	51,3	3,1
<b>214</b>	58,0	57,5	57,8	0,4	56,0	55,7	55,9	0,2	56,8	1,1
<b>220</b>	53,0	52,1	52,6	0,6	55,0	54,5	54,8	0,4	53,7	1,3
<b>222</b>	56,7	56,0	56,4	0,5	56,5	57,4	57,0	0,6	56,7	0,6
<b>227</b>	42,0	42,0	42,0	0,0	42,0	42,0	42,0	0,0	42,0	0,0
<b>230</b>	55,0	54,0	54,5	0,7	53,0	54,5	53,8	1,1	54,1	0,9
<b>234</b>	50,0	50,2	50,1	0,1	51,0	50,8	50,9	0,1	50,5	0,5
<b>236</b>	49,9	47,8	48,9	1,5	51,3	53,7	52,5	1,7	50,7	2,5
<b>237</b>	44,0	44,0	44,0	0,0	44,0	44,0	44,0	0,0	44,0	0,0
<b>238</b>	52,8	53,9	53,4	0,8	57,9	55,4	56,7	1,8	55,0	2,2
<b>239</b>	50,0	50,0	50,0	0,0	51,0	50,0	50,5	0,7	50,3	0,5
<b>240</b>	57,0	56,2	56,6	0,6	50,0	49,2	49,6	0,6	53,1	4,1
<b>241</b>	52,7	53,8	53,3	0,8	51,0	52,9	52,0	1,3	52,6	1,2
<b>242</b>	52,5	53,9	53,2	1,0	54,7	53,6	54,2	0,8	53,7	0,9
<b>245</b>	33,0	32,3	32,7	0,5	33,7	34,0	33,9	0,2	33,3	0,8
<b>246</b>	48,0	48,7	48,4	0,5	47,5	48,3	47,9	0,6	48,1	0,5
<b>247</b>	51,2	50,6	50,9	0,4	52,5	52,3	52,4	0,1	51,7	0,9
<b>248</b>	30,7	31,3	31,0	0,4	29,8	30,5	30,2	0,5	30,6	0,6
<b>249</b>	27,7	28,8	28,3	0,8	30,6	30,3	30,5	0,2	29,4	1,4
<b>250</b>	54,0	53,8	53,9	0,1	55,8	54,7	55,3	0,8	54,6	0,9
<b>251</b>	37,5	36,6	37,1	0,6	39,4	38,9	39,2	0,4	38,1	1,3
<b>252</b>	34,9	34,0	34,5	0,6	41,0	40,2	40,6	0,6	37,5	3,6
<b>253</b>	51,0	49,8	50,4	0,8	48,0	49,0	48,5	0,7	49,5	1,3
<b>254</b>	57,5	58,0	57,8	0,4	56,9	57,3	57,1	0,3	57,4	0,5
<b>255</b>	28,8	29,5	29,2	0,5	30,0	30,1	30,1	0,1	29,6	0,6
<b>263</b>	41,4	40,3	40,9	0,8	31,6	32,8	32,2	0,8	36,5	5,0
<b>263,1</b>	40,0	40,3	40,2	0,2	38,0	39,0	38,5	0,7	39,3	1,0
<b>264</b>	53,8	53,5	53,7	0,2	52,0	51,8	51,9	0,1	52,8	1,0
<b>272</b>	57,8	58,1	58,0	0,2	58,0	57,6	57,8	0,3	57,9	0,2
<b>280</b>	46,0	45,5	45,8	0,4	41,0	40,0	40,5	0,7	43,1	3,1
<b>2102</b>	47,0	47,0	47,0	0,0	47,0	47,0	47,0	0,0	47,0	0,0
<b>31</b>	39,0	38,0	38,5	0,7	46,0	47,2	46,6	0,8	42,6	4,7
<b>32</b>	57,5	57,0	57,3	0,4	55,8	56,0	55,9	0,1	56,6	0,8
<b>32P</b>	46,0	45,0	45,5	0,7	52,0	52,0	52,0	0,0	48,8	3,8
<b>32E</b>	56,0	56,0	56,0	0,0	53,0	54,0	53,5	0,7	54,8	1,5
<b>33</b>	51,8	51,5	51,7	0,2	51,3	51,5	51,4	0,1	51,5	0,2
<b>34</b>	57,2	58,1	57,7	0,6	56,7	56,3	56,5	0,3	57,1	0,8
<b>35</b>	55,0	54,5	54,8	0,4	54,0	55,0	54,5	0,7	54,6	0,5
<b>37</b>	45,0	45,0	45,0	0,0	45,0	45,0	45,0	0,0	45,0	0,0
<b>38</b>	55,6	56,0	55,8	0,3	55,7	54,8	55,3	0,6	55,5	0,5
<b>39</b>	58,0	57,9	58,0	0,1	57,8	58,0	57,9	0,1	57,9	0,1
<b>310</b>	48,8	49,3	49,1	0,4	50,0	49,4	49,7	0,4	49,4	0,5

<b>311</b>	47,0	47,5	47,3	0,4	47,5	47,3	47,4	0,1	47,3	0,2
<b>319</b>	45,0	45,0	45,0	0,0	44,0	44,3	44,2	0,2	44,6	0,5
<b>321</b>	58,0	57,3	57,7	0,5	56,7	57,1	56,9	0,3	57,3	0,5
<b>322</b>	55,9	55,3	55,6	0,4	56,0	56,5	56,3	0,4	55,9	0,5
<b>324</b>	58,0	58,0	58,0	0,0	57,8	58,1	58,0	0,2	58,0	0,1
<b>325</b>	54,1	53,8	54,0	0,2	52,6	53,1	52,9	0,4	53,4	0,7
<b>327</b>	56,0	56,0	56,0	0,0	53,0	52,5	52,8	0,4	54,4	1,9
<b>330</b>	52,0	51,8	51,9	0,1	47,0	47,5	47,3	0,4	49,6	2,7
<b>331</b>	44,0	45,0	44,5	0,7	50,0	49,4	49,7	0,4	47,1	3,0
<b>332</b>	57,0	57,3	57,2	0,2	59,0	58,7	58,9	0,2	58,0	1,0
<b>341</b>	59,0	58,0	58,5	0,7	56,4	57,2	56,8	0,6	57,7	1,1
<b>346</b>	48,0	48,0	48,0	0,0	53,0	52,8	52,9	0,1	50,5	2,8
<b>346,1</b>	45,0	44,0	44,5	0,7	48,0	47,3	47,7	0,5	46,1	1,9
<b>346,2</b>	45,0	44,6	44,8	0,3	50,0	49,7	49,9	0,2	47,3	2,9
<b>358</b>	55,8	55,4	55,6	0,3	56,0	57,0	56,5	0,7	56,1	0,7
<b>360</b>	50,0	50,0	50,0	0,0	53,0	52,5	52,8	0,4	51,4	1,6
<b>3100</b>	44,0	44,0	44,0	0,0	44,0	44,0	44,0	0,0	44,0	0,0
<b>3103</b>	56,0	56,0	56,0	0,0	52,0	51,8	51,9	0,1	54,0	2,4
<b>3104</b>	59,0	59,0	59,0	0,0	58,0	57,6	57,8	0,3	58,4	0,7

**ANEXO C** - Sequências consenso obtidas do gene que codifica para o rRNA 16S das seis linhagens selecionadas.

>Jag185

GCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTAT  
 GAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGAT  
 AACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATT  
 GAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTG  
 AGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC  
 ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCG  
 CAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCG  
 TAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGG  
 TACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT  
 GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTCT  
 GATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAGACTTGAGT  
 GCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGG  
 AACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGT  
 GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAA  
 GTGTTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGG  
 GGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGT  
 GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTC  
 TGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGT  
 TGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTG  
 ATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGA  
 GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC  
 TACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCCGCGAGGTGGAAGCTAATCTCATAAAA  
 CCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGT  
 AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCAGGCTTGTACACACCGCCCGT  
 CACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCCGGTGGGGTAACT

>Jag245

TCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAA  
 GCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGT  
 AAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCAT  
 GGGAGATGATTGAAAGATGGTTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTA  
 GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGG  
 TGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG  
 GGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG  
 CTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGCTTGT  
 ACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
 ATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTT  
 TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGG  
 AACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG  
 ATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAGTACTGACGCTGAGGCG  
 CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGAT  
 GAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCAC  
 TCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCG  
 ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT  
 GACATCCTCTGACAACTCTAGAGATAGAGGTTCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGG  
 TGGTGCATGGTTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAG  
 CGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGT

ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT  
ACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGG

>Jag248

AGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAA  
CACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACC  
GGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTAC  
AGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGA  
TGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGAC  
TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCA  
ACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACA  
AGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAA  
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG  
CGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGG  
GGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAGTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACG  
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCT  
GGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCC  
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGT  
GCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCCGCAAGACTGAAACTC  
AAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAA  
CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCC  
CTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGT  
TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGG  
CACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA  
TCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGC  
GAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGC  
AACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAA  
TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGA  
AGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATG

>Jag249

TCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAG  
CTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAA  
GACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGG  
TTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGC  
TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTG  
ATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG  
AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTT  
TCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTAC  
CTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCT  
TAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAA  
CTTGAGTGCAGAAGAGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT  
GTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGC  
GAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG  
AGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACT  
CCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCA  
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG  
ACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGG  
TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCTTGTATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGAC  
AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTAC

ACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCC  
 CACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAAT  
 CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC  
 CGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGA  
 GCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGAT

>Jag255

AGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCT  
 TGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGA  
 CTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTT  
 CAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA  
 GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT  
 CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA  
 TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTC  
 GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCT  
 TGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC  
 GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTT  
 AAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAC  
 TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATG  
 TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCG  
 AAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA  
 GTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTC  
 CGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC  
 AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGA  
 CATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGT  
 GCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA  
 ACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACA  
 AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA  
 CACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCC  
 ACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATC  
 GCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC  
 GCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAG  
 CCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATG

>Jag1732

GCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGG  
 ATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATA  
 ACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG  
 AAAGACGGTTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGG  
 GGTAATGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACA  
 CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC  
 AATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGT  
 AAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTA  
 CCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG  
 CAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGA  
 TGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGC  
 AGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAA  
 CACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTG  
 GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAG  
 TGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG  
 GAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG  
 GAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCT

GACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTT  
GTCGTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGA  
TCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAG  
GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT  
ACAATGGACAGAACAAAGGGCTGCAAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCATAAATCT  
GTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAA  
TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA  
CACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGC  
CGAAGGTGGGGCAGATGATTG