

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

**PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS OBTIDOS DE
SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS DO ESTADO DE SERGIPE
COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE
BIOSSURFACTANTES/BIOEMULSIFICANTES**

Autor (a): Thiara Santana Gomes

Orientadores: Prof. Dr. Luiz Fernando Romanholo Ferreira

Prof. Dr.^a Rebeca Yndira Cabrera Padilla

ARACAJU, SE - BRASIL.

MARÇO DE 2018

PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS OBTIDOS DE SEDIMENTOS DE
MANGUEZAIS DO ESTADO DE SERGIPE COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO
DE BIOSSURFACTANTES/BIOEMULSIFICANTES

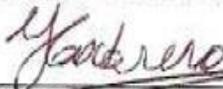
Thiara Santana Gomes

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS

Aprovada por:



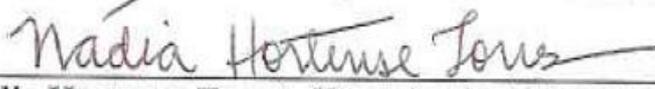
Dr. Luiz Fernando Romanholo Ferreira (Orientador PEP/UNIT)



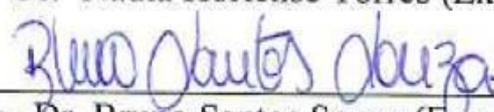
Dr.ª Rebeca Yndira Cabrera-Padilla (Orientadora)



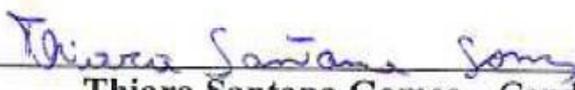
Dr.ª Cleide Mara Faria Soares (Examinadora Interna PEP/UNIT)



Dr.ª Nádia Hortense Torres (Examinadora Externa PEP/PNPD)



Dr. Bruno Santos Souza (Examinador Externo DEAM/UFS)



Thiara Santana Gomes – Candidata

ARACAJU, SE - BRASIL.

MARÇO DE 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

G633p Gomes, Thiara Santana
Prospecção de microrganismo obtidos de sedimentos de manguezais do estado de Sergipe com potencial para a produção de biossurfactantes/ bioemulsificantes / Thiara Santana Gomes; orientação [de] Prof.º Dr.º Luiz Fernando Romanholo Ferreira – Aracaju: UNIT, 2018.

79 f. il ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processo) - Universidade Tiradentes, 2018

Inclui bibliografia.

1. Actinobactéria. 2. Biossurfactantes. 3. Degradação de hidrocarbonetos. 4. Manguezal I. Gomes, Thiara Santana. II. Ferreira, Luiz Fernando Romanholo. (orient.). III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 604. 4: 615. 331

SIB- Sistema Integrado de Bibliotecas

*Por vezes sentimos aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar. Mas
o mar seria menos se lhe faltasse uma gota
(Madre Teresa de Calcutá)*

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Ao Instituto de tecnologia e pesquisa (ITP), e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes (UNIT), pela estrutura física e financiamento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Romanholo, pela oportunidade de trabalhar nesta dissertação. Pela amizade, profissionalismo, voto de confiança, incentivo, paciência e compreensão nas minhas dificuldades de trabalhar em uma nova área. Agradeço pelo voto de confiança.

À Profa. Dra. Luciana Maria de Hollanda, do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) da Universidade Tiradentes, por gentilmente permitir o uso dos equipamentos do LBMAT. Agradeço pela sempre disponibilidade em sanar quaisquer dúvidas.

À mestranda Tabata Guimarães, pelas trocas de experiências e amizade.

À toda a equipe do Laboratório, especialmente a IC Tereza Vitória Brito D'Avila, pela convivência e auxílio nos experimentos.

A todos os amigos que me acompanharam nessa jornada e estavam sempre torcendo pelo meu sucesso. Aos meus familiares especialmente meus pais, José dos Santos Gomes e Maria Felicidade Santana Gomes, que sempre acreditaram na minha capacidade e me incentivaram.

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processos.

PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS OBTIDOS DE SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS DO ESTADO DE SERGIPE COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES/BIOEMULSIFICANTES

Thiara Santana Gomes

O objetivo principal deste trabalho concentrou-se no *screening* de *actinomyetes* produtores de biossurfactantes/bioemulsificantes para aplicação na biodegradação de compostos derivados de petróleo. As bactérias foram coletadas a partir do solo de manguezais do estado de Sergipe, devido à sua diversidade microbiana pouco explorada. Estes microrganismos têm capacidade de produzir moléculas surfactantes que apresentam baixa toxicidade e elevada biodegradabilidade, não oferecendo riscos ao ambiente. Os biossurfactantes/bioemulsificantes têm grande interesse na indústria de petróleo, como agentes de limpeza para recuperação da área contaminada por óleos. Neste contexto este estudo realizou experimentos para avaliação do potencial de produção de biossurfactantes/bioemulsificantes das amostras isoladas. Do total de 88 isolados, 16 apresentaram características surfactantes. De 16 isolados, 10 apresentaram resultados positivos para produção de enzimas extracelulares biossurfactantes, e 7 para produção de bioemulsificantes. Os *screenings* realizados consistiram em testes de colapso da gota, dispersão do óleo, tensão superficial e índice emulsificante. Os resultados mostraram que os solos coletados de duas regiões de Sergipe apresentaram potencial para produção do bionsoativo, de forma que foi possível obter dez isolados com capacidade surfactante para reduzir a tensão superficial. Dentre elas, as cepas 10F2- BA e 4B2-13 foram as que obtiveram maior redução, com cerca de 57,14% (31,07 mN/m) e 56,51% (31,53 mN/m), respectivamente. A capacidade emulsificante foi medida com base nos hidrocarbonetos xileno, tolueno, benzeno e querosene. A cepa 6C3-13 apresentou o maior valor de E_{24} de 26,47%; 21,88%; 62,07% e 11,43%, correspondendo respectivamente aos hidrocarbonetos citados anteriormente.

Palavras-chave: Actinobactéria, Biossurfactantes, Degradação de Hidrocarbonetos, Manguezal.

Abstract of Dissertation presented to the Process Engineering Graduate Program of Universidade Tiradentes as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

PROSPECTION OF MICRORGANISMS OBTAINED FROM MANGROVES'
SEDIMENTS IN THE STATE OF SERGIPE WITH POTENCIAL FOR
BIOSURFACTANTS/BIOEMULSIFIERS PRODUCTION

Thiara Santana Gomes

The main objective of this study was to prospect for *actinomyetes* acting as biosurfactants/bioemulsifiers to apply in the degradation of petroleum derived compounds. Potential microorganisms were extracted from mangrove soil sampled from the state of Sergipe. These unexplored unique ecosystems have a microbial diversity that plays an essential role in maintaining the productivity, conservation and recovery of surrounding environments, as well as its ability to produce biological surfactants. Biosurfactants and bioemulsifiers are relevant in the oil industry as cleaning agents for the recovery of oil contaminated areas. These compounds have low toxicity and high biodegradability, offering no risk to the environment. In this context, we carried out experiments to evaluate the biosurfactant/bioemulsifier production potential of isolated samples. The performed screenings consisted of tests of drop collapsing, oil dispersion, surface tension and emulsifying index. The results showed that the soils sampled from two regions of Sergipe revealed biosurfactant production. Ten of the isolated strains had a surfactant capacity to reduce surface tension. Among them, the 10F2-BA and 4B2-13 strains had the highest reduction, with 57.14% (31.07mN/m) and 56.51% (31.53 mN/m), respectively. The emulsifying capacity was measured based on the hydrocarbons xylene, toluene, benzene and kerosene. Strain 6C3-13 presented the highest E₂₄ value of 26.47%; 21.88%; 62.07% and 11.43%, corresponding respectively to the hydrocarbons mentioned above.

Keywords: Actinomycetes, Biosurfactants, Hydrocarbon Degradation, Mangrove.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. OBJETIVO GERAL	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. O BIOMA MANGUEZAL	5
3.1.1 Manguezais no Cenário Nacional.....	8
3.2. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES/BIOEMULSIFICANTES	9
3.2.1 Actinobactérias	10
3.3. MOLÉCULAS SURFACTANTES	13
3.3.1 Surfactantes sintéticos	15
3.3.2 Surfactantes biológicos.....	17
3.3.2.1 Caracterização dos surfactantes biológicos	18
3.4. APLICAÇÃO	22
4 MATERIAS E MÉTODOS	27
4.1 REGIÃO DA COLETA	27
4.2 COLETA DE AMOSTRAS DO SOLO DO MANGUE.....	28
4.3 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS.....	30
4.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS BACTÉRIAS	31
4.4.1. Coloração de Gram	31
4.4.2 Teste da Oxidase.....	32
4.4.3 Teste de urease.....	32
4.4.4 Teste de Catalase	33
4.4.5 Teste de hidrólise de amido	33
4.4.6 Ensaio hemolítico	34
4.5 TESTE DE FERMENTAÇÃO DAS LINHAGENS SELECIONADAS	34
4.6 PRODUÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES/BIOEMULSIFICANTES	35
4.6.1 Avaliação da capacidade surfactante	35
4.6.2 Tensão superficial.....	35
4.6.3 Índice de emulsificação E ₂₄	36
4.6.4 Determinação da atividade emulsificante	36
5.1 ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS BACTERIANAS	37
5.2 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS	38
5.3 PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS BIOSSURFACTANTES.....	41
5.3.1 Capacidade emulsificante	46
6. CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	52

LISTA DE FIGURAS

<i>FIGURA 1: A CAUDA CORRESPONDE À PORÇÃO APOLAR (HIDROFÓBICA) E A CABEÇA À PORÇÃO POLAR (HIDROFÍLICA) (SANTOS ET AL., 2016).</i>	13
<i>FIGURA 2: ILUSTRAÇÃO DOS AGENTES TENSIOATIVO E FORMAÇÃO DE MICELAS (SANTOS ET AL., 2016).</i>	14
<i>FIGURA 3: ESQUEMA DA RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA DOS BIODERIVADOS E FORMAÇÃO DE MICELA (DE ET AL., 2015).</i>	14
<i>FIGURA 4: SUBCLASSES E ESTRUTURAS QUÍMICAS DE GLICOLIPÍDIOS; A) RAMNOLIPÍDIOS; B) TREALOSELIPÍDIOS; C) SOFOROLIPÍDIOS (NITSCHKE E PASTORE, 2002).</i>	18
<i>FIGURA 5: ESTRUTURA DA SURFACTINA, SURFACTANTE LIPOPEPTÍDICO (JOY ET AL., 2017).</i>	19
<i>FIGURA 6: ESTRUTURA DO FOSFOLIPÍDIO (NITSCHKE E PASTORE, 2002).</i>	20
<i>FIGURA 7: ESTRUTURA QUÍMICA EMULSAN PRODUZIDO PELA ACINETOBACTER CALCOACETICUS RAG-1 (JOY ET AL., 2017).</i>	20
<i>FIGURA 8: ESTRUTURA MOLECULAR DO TOLUENO, BENZENO E ORTO-XILENO.</i>	25
<i>FIGURA 9: MAPA REPRESENTANDO O ESTADO DE SERGIPE NO TERRITÓRIO NACIONAL, BEM COMO SUAS SUB-REGIÕES, OS PRINCIPAIS RIOS E OS MANGUEZAIS.</i>	27
<i>FIGURA 10: MANGUEZAL PRÓXIMO AO POVOADO PORTO DAS CABRAS LOCALIZADO NO MUNICÍPIO BARRA DOS COQUEIROS-SE. A) ECOSISTEMA SEM AÇÃO ANTRÓPICA; B) VEGETAÇÃO CARACTERÍSTICA DO MANGUEZAL.</i>	28
<i>FIGURA 11: MANGUEZAL DA PRAIA FORMOSA LOCALIZADA NO BAIRRO 13 DE JULHO. A) LANÇAMENTO DE EFLUENTES NO CURSO HÍDRICO; B) VEGETAÇÃO REMANESCENTE DO MANGUEZAL.</i>	28
<i>FIGURA 12: PONTOS DAS COLETAS REALIZADAS NO MUNICÍPIO DA BARRA DOS COQUEIROS. IMAGEM DE SATÉLITE OBTIDA ATRAVÉS DO GOOGLE MAPS.</i>	29
<i>FIGURA 13: PONTOS DAS COLETAS REALIZADAS NO BAIRRO 13 DE JULHO DA CIDADE DE ARACAJU IMAGEM DE SATÉLITE OBTIDA ATRAVÉS DO GOOGLE MAPS.</i>	29
<i>FIGURA 14: ASPECTO VISUAL DE ALGUNS ISOLADOS OBTIDOS DAS ACTINOBACTÉRIAS.</i>	37
<i>FIGURA 15: ASPECTO VISUAL COM OS RESULTADOS PARA DETECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE A-HEMÓLISE, B-HEMÓLISE E Γ-HEMÓLISE. A) FRENTE DA PLACA ÁGAR SANGUE E BACTÉRIA INOCULADA; B) VERSO DA PLACA DO ÁGAR SANGUE.</i>	40
<i>FIGURA 16: ASPECTO DO RESULTADO POSITIVO PARA DETECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE A-AMILASES (AMOSTRA 4B2-13).</i>	41
<i>FIGURA 17: TESTE DO COLAPSO DE GOTA; A) CONTROLE; B) AMOSTRA 6C2-BA; C) AMOSTRA 4B6-13; D) AMOSTRA 10F2-BA; E) AMOSTRA 1.2A5-13; F) AMOSTRA 5C4-13.</i>	42
<i>FIGURA 18: TESTE DO ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO AMOSTRAS 24 H APÓS A AGITAÇÃO DA AMOSTRA 10F2 PARA: A) TOLUENO, B) XILENO; C) QUEROSENE; D) BENZENO.</i>	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: EXEMPLO DE ALGUMAS BACTÉRIAS ISOLADAS EXTRAÍDAS DE SOLOS DE MANGUEZAIS.	6
TABELA 2: FÓRMULA MOLECULAR DE ALGUNS TIPOS DE SURFACTANTES SINTÉTICOS.....	15
TABELA 3: PRINCIPAIS TIPOS DE BIOSSURFACTANTES E SEUS RESPECTIVOS SUBGRUPOS, CLASSES E OS MICRORGANISMOS PRODUTORES.....	21
TABELA 4: APLICAÇÕES DOS BIOSSURFACTANTES.....	22
TABELA 5: COMPOSIÇÃO QUÍMICA TÍPICA DO PETRÓLEO.....	25
TABELA 6: PONTO DE COLETA, GEOLOCALIZAÇÃO E MASSA DAS AMOSTRAS DE SEDIMENTO DO MANGUEZAL LOCALIZADO NO POVOADO PORTO DAS CABRAS, MUNICÍPIO DE BARRA DOS COQUEIROS/SE.....	30
TABELA 7: PONTOS DE COLETA, GEOLOCALIZAÇÃO E MASSA DAS AMOSTRAS DE SEDIMENTO DE MANGUEZAL DA LOCALIZADO NO MUNICÍPIO DE ARACAJU/SE.....	30
TABELA 8: CARACTERÍSTICAS DOS ISOLADOS BACTERIANOS ESTUDADOS. BACTÉRIAS COM O SUFIXO BA FORAM ISOLADAS DO MANGUEZAL DA BARRA DOS COQUEIROS-SE, ENQUANTO AQUELAS COM A CODIFICAÇÃO 13 SÃO ORIUNDAS DO MANGUEZAL DA PRAIA FORMOSA-SE.....	38
TABELA 9: RESULTADOS DA TENSÃO SUPERFICIAL, TESTE DO COLAPSO DA GOTA E DISPERSÃO DO ÓLEO UTILIZANDO OS SOBRENADANTES LIVRES DE CÉLULAS DAS AMOSTRAS.....	43
TABELA 10: VALORES CALCULADOS DE E24 E ATIVIDADE EMULSIFICANTE EM FUNÇÃO DO MEIO.....	47

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

Os manguezais são ecossistemas costeiros, característicos das regiões tropicais e subtropicais, ocupando cerca de 18 milhões de hectares. Países como Brasil, Indonésia e Austrália possuem a maior abundância de manguezais do mundo (SANTOS *et al.*, 2011). Todavia, os manguezais estão sendo ameaçados pela ação antrópica através do descarte de efluentes domésticos não tratados, tornando-os ambientes próximos à extinção (BRITO *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2011).

Em Sergipe é verificada a existência de manguezais em toda a extensão litorânea do estado. Devido à presença de diversas bacias hidrográficas (incluindo a bacia do rio São Francisco, uma das mais importantes do país), há uma grande extensão de manguezais do sul ao norte do litoral, concedendo à capital o título de “capital dos mangues”. Até então, poucos trabalhos foram realizados quanto à caracterização dos mangues locais, tornando raros os inventários biológicos dessa região. Dentre os manguezais do estado de Sergipe, existem casos de pouca ou nenhuma interferência humana, e casos de ação antrópica intensa que culminou na degradação do ecossistema ao longo dos anos (KILCA *et al.*, 2010).

A degradação pode ser fruto de diversos fatores, como desmatamento, ocupação imobiliária, problemas de infraestrutura e acúmulo de resíduos tanto sólidos quanto líquidos. Alguns estudos evidenciaram que as ações antrópicas podem alterar o ecossistema e as atividades ecológicas presentes nos manguezais (REIS NETO *et al.*, 2011).

Os sedimentos dos manguezais dispõem de uma diversidade microbiana que desempenham papéis essenciais na manutenção do ecossistema, influenciada por propriedades biogeográficas, antropogênicas e ecológicas, incluindo a rede alimentar no ecossistema, ciclagem de nutrientes, presença de compostos orgânicos e inorgânicos no sedimento (MASON *et al.*, 2014). Essa diversidade microbiana é fundamental para a manutenção da produtividade, conservação e recuperação destes ambientes (SANTOS *et al.*, 2011).

Assim, a comunidade microbiana encontrada nestes ambientes considerados únicos sobrevive em condições de elevadas temperaturas e salinidade. Estes microrganismos vivos presentes nos manguezais são responsáveis pela transformação de nutrientes, fixação de nitrogênio, metanogênese (degradação anaeróbica da matéria orgânica biodegradável em

metano e dióxido de carbono), solubilidade de fosfato, redução de sulfato e metabolizar compostos orgânicos, tais como hidrocarbonetos (petrolíferos) a partir dos biossurfactantes (FAGNANI *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2013; ROCHA *et al.*, 2013).

Os surfactantes podem ser químicos ou biológicos (biossurfactantes). Os surfactantes sintéticos são produzidos a partir de fontes petroquímicas, utilizados em aplicações industriais em grande escala (para fins de limpeza, como detergentes) e também no campo de remediação ambiental (descontaminando áreas que sofreram derramamento de óleo) (SAN KESKIN *et al.*, 2015; DEEPIKA *et al.*, 2016; MNIF *et al.*, 2017).

Já os surfactantes biológicos produzidos pelos microrganismos (leveduras, fungos e bactérias), possuem propriedades únicas, tais como melhor solubilização, aumentando assim a sua biodisponibilidade e, dessa forma, melhorando o grau de biodegradação de áreas contaminadas. Apresentam baixa toxicidade, possuem elevada atividade emulsificante e têm a capacidade de permanecer ativos em sistemas ambientais extremos. As aplicações de biossurfactantes compreendem emulsificação, formação de espuma, dispersão, aumento do crescimento microbiano, agentes antimicrobianos, redução da tensão superficial, sequestro de metais e recuperação de óleo (WONGWONGSEE *et al.*, 2013; DEEPIKA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016).

Uma série de bactérias são capazes de metabolizar hidrocarbonetos, e nos últimos anos foram estudadas. Dentre elas, os actinomicetos apresentam diversas propriedades que os tornam bons candidatos para a aplicação no tratamento de poluentes orgânicos. Durante o seu metabolismo, estes microrganismos produzem enzimas extracelulares que apresentam atividade lipolítica e atuam na interface água-óleo, determinando assim, seu potencial para a produção de biossurfactantes (FERRADJI *et al.*, 2014; CHAKRABORTY *et al.*, 2015). Embora algumas espécies de actinobactérias já foram estudadas, existe a necessidade de identificar novos microrganismos deste grupo, devido ao baixo número pesquisas relacionadas a actinobactérias utilizadas para a produção de biossurfactantes.

Os actinomicetos são uma fonte rica de metabólitos secundários. Dentre estes metabólitos, destacam-se os biossurfactantes produzidos na fase estacionária do crescimento microbiano (CHAKRABORTY *et al.*, 2015). O gênero *Pseudomonas* sp. representa um dos melhores produtores de biossurfactantes conhecidos atualmente, porém possui características nocivas à saúde humana, o que dificulta a sua produção em larga escala. Assim, actinomicetos

se mostram bons candidatos para a produção de biossurfactantes devido às suas características não patogênicas (ZAMBRY *et al.*, 2017).

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo o isolamento de microrganismos produtores de biossurfactantes/bioemulsificantes coletados de manguezais para aplicação na biodegradação de compostos provenientes de petróleo (hidrocarbonetos como tolueno, xileno, benzeno e querosene).

Capítulo 2

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Isolar os microrganismos (bactérias) de solo dos manguezais em regiões não impactadas e impactadas antropicamente, localizados no estado de Sergipe, com capacidade potencial de produzir biossurfactantes/bioemulsificantes.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e isolar os microrganismos dos manguezais da Praia Formosa (Aracaju-SE) e do povoado Porto das Cabras (Barra dos Coqueiros – SE);
- Selecionar entre os microrganismos isolados do manguezal, aquelas capazes de crescer em meio específico para Actinobactérias;
- Realizar testes bioquímicos nos isolados;
- Selecionar os microrganismos produtores de moléculas biossurfactantes/bioemulsificantes extracelulares através dos testes de colapso da gota, dispersão em óleo, tensão superficial, índice (E24) e atividade emulsificante.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O Bioma Manguezal

O manguezal é composto por matéria orgânica espessa, solubilizado nos sedimentos, que são fundamentais como fonte de nutrientes e substrato físico para o desenvolvimento da vegetação (BEHERA *et al.*, 2014). Eles podem ser comumente encontrados em regiões tropicais e eventualmente subtropicais, como uma transição entre os ecossistemas terrestre e marinho, apresentando uma importante diversidade no ambiente, tais como proteger a costa, controlar inundações, proteção contra tempestades e retenção de nutrientes (KATHIRESAN e BINGHAM, 2001; NGUYEN *et al.*, 2017).

Os mangues são ambientes anaeróbios, exceto a superfície do sedimento, o qual possui um ecossistema com baixa biodiversidade, onde poucas espécies suportam suas condições estressantes como pressão, umidade, altas temperatura e salinidade, limitações de luz, ar, minerais e fontes nutritivas, solos anaeróbicos e ventos fortes, além de desenvolverem relações ecológicas com diversos organismos (XU, 2011; AZMAN *et al.*, 2015). Por estas razões, os ecossistemas marginais são vulneráveis, frágeis e considerados únicos, pois há poucos ecossistemas que apresentam essas características (KATHIRESAN e BINGHAM, 2001; VANNUCCI, 2001; BEHERA *et al.*, 2016).

É possível caracterizar os manguezais através das suas diferenças fisionômicas, de acordo com a sua idade. Ecossistemas novos apresentam uma elevada densidade e indivíduos de pequeno porte. Caso existam indícios de supressão de vegetação em diferentes níveis, o manguezal é considerado de idade intermediária. Quando a vegetação apresentar um porte maior, é considerada avançada. Tal classificação é importante devido ao fato de manguezais em idades iniciais apresentarem uma maior diversidade de espécies, enquanto que os mais avançados tendem a abrigar uma variedade menor de seres vivos (KILCA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2018)

Frequentemente os sedimentos dos manguezais têm características argilosas e possuem baixas concentrações dos nutrientes inorgânicos dissolvidos (com exceção do NH_4^+). Suas vegetações têm propriedades físicas, químicas e biológicas, crescem em variados tipos de solos,

textura e composição química diversificada, dispondo de uma capacidade de acumular metais pesados e adsorver nutrientes (CORREIA e GUIMARÃES, 2017; NGUYEN *et al.*, 2017).

Os microbiomas que habitam os sedimentos presentes nos mangues desempenham um papel fundamental na cadeia alimentar desse ecossistema, bem como seus ciclos de nutrientes e biogeoquímicos. Consequentemente, essas comunidades microbianas são altamente influenciadas pela disponibilidade de nutrientes, propriedades ecológicas e antropogênicas (AL-AMOUDI *et al.*, 2016).

Por serem rodeados de sedimentos soltos, as raízes, troncos e galhos submersos no mangue, formam espaço para habitar determinadas espécies animais, tais como os peixes e crustáceos, e para algumas espécies de aves construir seus ninhos. Hospedam também outros grupos de organismos como ricas comunidades epifauna (compreende os substratos que vivem sobre ou associado a sedimentos), consistem nos microrganismos associados a fungos, bactérias, macroalgas e animais, fornecem grandes quantidades de matéria orgânica para a água costeira na forma de detritos, possuem uma fonte rica em energia e abrangem uma população microbiana ativa. Em torno de 30 a 50% da matéria orgânica nas folhas do mangue são solúveis em água, constituída por polímeros estruturais vegetais (KATHIRESAN e BINGHAM, 2001; BEHERA *et al.*, 2016).

Os principais processos que causam a retenção e degradação de substâncias ocorrem pela ação dos microrganismos e das raízes dos manguezais. Nas regiões tropicais, as bactérias e fungos constituem 91% da biomassa microbiana total, enquanto as algas constituem 7% e os protozoários 2%. A estrutura e função microbiana dos manguezais são responsáveis pelo funcionamento do ecossistema (GRATIVOL *et al.*, 2017; NGUYEN *et al.*, 2017).

Na Tabela 1 é apresentada uma variedade de bactérias isoladas de manguezais de diferentes regiões e suas aplicações, bem como o tipo de biossurfactante produzido e o local de extração.

Tabela 1: Exemplo de algumas bactérias isoladas extraídas de solos de manguezais.

Bactérias	Tipo de biossurfactantes	Local	Aplicação	Referencia
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Lipopeptídeos	Ilhas de Andamão e Nicobar	Atividade mosquitocida	GEETHA <i>et al.</i> , 2011
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> VCRC B483	Lipopeptídeos	Ilhas de Andamão e Nicobar	Biossurfactante mosquitocida	GEETHA <i>et al.</i> , 2014

Continuação Tabela 1.

Bactérias	Tipo de biossurfactantes	Local	Aplicação	Referência
<i>Bacillus brevis</i>	-	Makadi vallige, região Hurghada, Egito	Potencial como emulsificante	MOUAFI <i>et al.</i> , 2016
<i>Bacillus licheniformis</i> KC710973	Lipopeptídeos	Kakinada, Andhra Pradesh, Índia	Degradação da naftalina e óleo bruto	KUMAR <i>et al.</i> , 2016
<i>Bacillus licheniformis</i> TR7 e <i>Bacillus subtilis</i> SA9	Lipopeptídeos	Sul da Tailândia	Recuperação de óleo, agentes emulsionantes na indústria de alimentos, indústria petrolífera e em aplicações ambientais, limpeza de reservatórios de óleo, redução da viscosidade do óleo para transporte de petróleo bruto e decomposição de óleos derramados em ambientes de solo ou marinhos.	SAIMMAI <i>et al.</i> , 2011
<i>Bacillus pumilus</i> CCMA-560	-	Bertioga, São Paulo, Brasil	Recuperação de petróleo.	DOMINGOS <i>et al.</i> , 2013a
<i>Bacillus safensis</i> CCMA-560	Lipopeptídeos	Bertioga, São Paulo, Brasil	Recuperação de petróleo.	DOMINGOS <i>et al.</i> , 2015
<i>Bacillus</i> sp.	Lipopeptídeos	Nelore, Andhra Pradesh, Índia	Remoção de PAH dos solos contaminados	KUMAR <i>et al.</i> , 2015
<i>Bacillus subtilis</i> ICA56	Lipopeptídeos	Icapui, Ceara, Brazil	Biodegradação	DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2017
<i>Gordonia amicalis</i> CCMA-559	-	Bertioga, São Paulo, Brasil	Aplicação industrial	DOMINGOS <i>et al.</i> , 2013b
<i>Halobacillus dabanensis</i> mh1 e <i>Pontibacillus chungwhensis</i> mh2	Lipopeptídeos	Avicennia Marina, Egito	Degradabilidade de hidrocarbonetos	KHEIRALLA <i>et al.</i> , 2013
<i>Inquilius limosus</i> KB3	Lipopeptídeos	Sul da Tailândia	Recuperação melhorada do petróleo (MEOR) e redução da intensidade da contaminação ambiental.	SAIMMAI <i>et al.</i> , 2013
<i>Leucobacter komagatae</i> 183	Lipopeptídeos	Província de Trang no sul da Tailândia	Recuperação melhorada do petróleo (MEOR) e redução da intensidade da contaminação ambiental.	SAIMMAI <i>et al.</i> , 2012
<i>Novosphingobium pentaromativorans</i> PY1, <i>Ochrobactrum</i> sp. PW1 e <i>Bacillus</i> sp. FW1	-	Phetchaburi província de Tailândia	Degradação de pireno e biorremediação	WANAPAISAN <i>et al.</i> , 2018
<i>Oleomonas sagaranensis</i> AT18	Glicolipídeos	Sul da Tailândia	Recuperação melhorada do petróleo (MEOR) e redução da intensidade da contaminação ambiental.	SAIMMAI <i>et al.</i> , 2012
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KVD-HM52	Ramnolipídeos	Krishna, Machilipatnam, Andhra Pradesh, Índia.	Antifúngico, usado como uma alternativa para substituir o prejudicial agroquímicos	DEEPIKA <i>et al.</i> , 2015
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KVD-HR42	Ramnolipídeos	Kakinada, Andhra Pradesh, Índia	Aplicação industrial	DEEPIKA <i>et al.</i> , 2016; DEEPIKA <i>et al.</i> , 2017
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PBSC1	Glicolipídeos	Tamil Nadu, Índia	Produção de substratos agroindustriais	ANNA JOICE; PARTHASARATHI, 2014

Continuação Tabela 1

Bactérias	Tipo de biossurfactantes	Local	Aplicação	Referencia
<i>Pseudomonas fluorescens</i> MFS03	Ramnolipídeos	Pichavaram, Índia	Atividade antimicrobiana	GOVINDAMMAL; PARTHASARATHI, 2013
<i>Pseudomonas fluorescens</i> MFS03	Ramnolipídeos	Tamil Nadu, Índia	Processos de aplicação de biorremediação	GOVINDAMMAL, 2014
<i>Pseudomonas fluorescens</i> MFS-1	Ramnolipídeos	Tamil Nadu, Índia	Nano partículas	MARAGATHAM; GOVINDAMMAL, 2014
<i>Pseudomonas nitroreducens</i> TSB.MJ10	Lipopeptídeos	Rio Mandovi, Goa, Índia	Biorremediação de hidrocarbonetos em ambientes marinhos, gerenciamento de derramamento de óleo e recuperação melhorada de óleo.	DE SOUSA; BHOSLE, 2012
<i>Selenomonas ruminantium</i> CT2	Lipopeptídeos	Sul da Tailândia	Recuperação melhorada do petróleo (meor) e redução da intensidade da contaminação ambiental.	SAIMMAI <i>et al.</i> , 2013

3.1.1 Manguezais no Cenário Nacional

O Brasil possui a terceira maior área de manguezal do mundo, correspondendo a 50% dos manguezais da América do Sul (SANTOS *et al.*, 2014). Devido a esse número, diversas leis e decretos foram criadas para gerenciar a conservação deste ecossistema, eventualmente sendo considerado pelo CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) uma Área de Preservação Permanente (REIS NETO *et al.*, 2011).

Na região nordeste, a incidência de manguezais nos estuários dos rios é muito presente, comumente tendo importância para populações ribeirinhas (SANTOS *et al.*, 2014) que interagem com este ecossistema através de extração de argila, agricultura, aquicultura, produção de sal e outras atividades industriais. Nas proximidades das zonas urbanas, é muito comum o descarte de efluentes e resíduos sólidos nos manguezais, causando um impacto ambiental severo (ISAAC e FERRARI, 2017).

O estado de Sergipe possui 256,26 km² de manguezais, equivalente a 1,17% da área total do estado (ADEMA, 2014). Banhado por 8 bacias hidrográficas diferentes, possui manguezais ao longo dos seus estuários. Dentre os rios que cruzam a capital sergipana, podemos citar os seguintes manguezais contidos nas suas margens: manguezal do rio Poxim, nos bairros São Conrado, Farolândia e Jabotiana; manguezais do rio Poxim nos bairros Inácio Barbosa e Coroa do Meio; manguezais do riacho Tramandaí/Rio Sergipe, nos bairros Jardins e Treze de Julho; manguezais do rio do Sal e rio Sergipe, nos bairros Industrial, Lamarão e Porto Dantas,

Zona Norte da Cidade; manguezais da Zona de Expansão urbana de Aracaju, nas margens do rio Vaza Barris e rio Santa Maria (PMA/SEPLOG, 2014).

De acordo com SOUZA *et al.* (2018), o manguezal localizado nas margens do rio Poxim possui uma concentração de hidrocarbonetos inferior às concentrações encontradas em diferentes manguezais localizados ao redor do mundo (Salvador, Austrália, Djibouti, Índia e sudeste brasileiro). Segundo ISSAC e FERRARI (2017) derramamentos de óleo em áreas costeiras que não atingem altas profundidades são mais danosos para biomas litorâneos do que em locais cuja extração do petróleo é realizada em grandes profundidades, como a costa sergipana.

3.2 Microrganismos Produtores de Biossurfactantes/Bioemulsificantes

Os microrganismos estão presentes em inúmeros ambientes, adaptando-se e sobrevivendo em meios considerados hostis, desempenhando papel fundamental na manutenção do ecossistema. Possuem uma das maiores diversidades genéticas disponíveis entre os seres vivos, a qual ainda é pouco descrita e explorada (PROSSER *et al.*, 2007). A diversidade microbiana apresenta um fator limitante na reconstituição das condições ambientais em laboratório necessárias para o crescimento microbiológico. Assim, por ser cultivado em pequena quantidade, esses organismos apresentam informações limitadas. Estudos comparativos indicam que menos de 1% dos microrganismos presentes na natureza são cultivados através de métodos convencionais (ROSZAKT e COLWELL, 1987; LIANG *et al.*, 2016).

Os organismos vivos contribuem para o equilíbrio do ecossistema, atuando na remoção de matéria orgânica, como fonte de nutrientes, e estão envolvidos em processos de degradação de poluentes (GARCIA, 1995; CHODAK *et al.*, 2013).

As comunidades microbianas com característica surfactantes têm capacidade para acelerar o processo de biodegradação em um ecossistema contaminado. Esses microrganismos degradam o óleo, seguindo um padrão que é caracterizado por duas fases. A primeira fase consiste na degradação rápida reduzindo a tensão interfacial, enquanto na segunda ocorre uma degradação lenta que aumenta a solubilização dos contaminantes retidos na fase aquosa (GARCIA, 1995; GRATIVOL *et al.*, 2017; MNIF *et al.*, 2017; SIVAPERUMAL *et al.*, 2017).

As bactérias possuem diferentes estimativas sobre o número de suas espécies, permitindo-as ocupar os mais diferentes nichos da biosfera e podem ser encontradas em quase todos os ambientes terrestres. Por obter uma grande variedade genética e metabólica têm uma fonte potencial de bioprodutos (RODRÍGUEZ-VALERA, 2004).

Dentro de uma espécie de bactérias existe uma grande variedade genômica. O genoma é definido como o total de genes da linhagem caracterizada da espécie, podendo ser dividido em dois componentes: o grupo essencial que possuem em média 95% das linhagens e o grupo auxiliar que pode ser encontrado de 1 a 95% das linhagens, sendo estes genes ligados a adaptação da espécie em diferentes ambientes (BOUCHER *et al.*, 2001).

Além dos grupos de bactérias, outro grupo de microrganismos, como os fungos, podem apresentar capacidade de produção e secreção de enzimas e surfactantes/emulsificantes para a degradação de hidrocarbonetos (derivados), tais como alcanos (normal, ramificado, cíclico) e hidrocarbonetos aromáticos. São úteis para produzir metabólitos primários e secundários aplicáveis industrialmente, como peptídeos, enzimas, ácidos orgânicos, biosurfactantes, bioemulsificantes e antibióticos (ANDRADE *et al.*, 2010; VALENCIA e CHAMBERGO, 2013).

3.2.1 Actinobactérias

As bactérias podem ser Gram-positivas ou Gram-negativas. Assim utiliza-se o método de coloração de Gram para diferenciá-las, baseando-se nas características da parede celular e na capacidade de retenção do corante. Assim, as bactérias Gram-positivas irão reter o corante, enquanto que Gram-negativas perdem-no (BEVERIDGE, 2000; WILHELM *et al.*, 2015; BHIMJI e UNAKAL, 2018).

As actinobactérias, filo Actinobacteria, são bactérias gram-positivas com elevada razão de guanina (G) e citosina (C) em seu DNA, que junto ao sequenciamento do RNA 16s ribossomal, são utilizadas no estudo das relações evolutivas entre os grupos de bactérias (GOODFELLOW e WILLIAMS, 1983). O filo Actinobacteria representa um dos maiores grupos taxonômicos dentre as 18 maiores linhagens atualmente organizadas no domínio *Bacteria*, possuindo assim 5 subclasses, 6 ordens, e 14 subordens (VENTURA *et al.*, 2007; LUDWIG *et al.*, 2012; BARKA *et al.*, 2016).

Tais bactérias apresentam uma grande variedade morfológica, como bacilos (bactéria em forma de bastonetes), cocos (a forma da bactéria é esférica ou ovoide), como também hifas fragmentadas e micélios ramificados altamente diferenciados, permanentes e extensos. A maioria delas precisa de oxigênio para a sua sobrevivência, sendo denominadas como seres aeróbicos. Quanto à nutrição, grande parte das actinobactérias são quimioheterótrofas, sendo capazes de utilizar as mais diversas fontes de nutrientes (incluem-se os polissacarídeos complexos). Algumas espécies não realizam fotossíntese (heterótrofas), enquanto outras utilizam a energia resultante da quebra de ligações químicas de compostos orgânicos para sintetizar substâncias orgânicas (quimioautotróficas) (GOODFELLOW e WILLIAMS, 1983; ATLAS, 1997; VENTURA *et al.*, 2007; BARKA *et al.*, 2016).

Esses organismos formam um micélio (rede de filamentos entrelaçados, responsáveis pela sustentação, nutrição e reprodução) que se desenvolve no interior do substrato em meios de cultura sólidos e submersos. Nas superfícies sólidas ocorre a formação de hifas (filamentos formadores do micélio) aéreas, nas quais o principal objetivo é a produção de esporos reprodutivos (VENTURA *et al.*, 2007; MAHAJAN e BALACHANDRAN, 2012; BARKA *et al.*, 2016). Os esporos podem ser formados no substrato ou nos micélios aéreos, na forma de células simples ou agrupadas em cadeias de diferentes tamanhos. A caracterização de espécies do filo pode ser realizada baseado no aspecto morfológico do esporo, o qual pode apresentar uma superfície lisa, espessa, com espinhos, com pelos ou rugosa (BARKA *et al.*, 2016; LEWIN *et al.*, 2017).

Pigmentos melanóides também são produzidos por esse grupo de bactérias. Eles podem apresentar coloração rosa, amarela, laranja, vermelha, marrom, azul ou preta, a depender da espécie, do meio usado e do tempo de existência da cultura. A melanina é um polímero com variadas estruturas moleculares, as quais são usualmente pretas ou marrons, e é formada através de uma polimerização oxidativa de compostos fenólicos e indólicos (BARKA *et al.*, 2016)

As actinobactérias são consideradas organismos de vida livre, pois encontram-se nos mais diversos ecossistemas, sejam eles manguezais, costas marítimas, mares e o fundo de oceanos, formando assim uma população estável e permanente (SOLECKA *et al.*, 2012; ADEGBOYE e BABALOLA, 2013; BARKA *et al.*, 2016; KAMJAM *et al.*, 2017). O seu crescimento nesses habitats é influenciado pela temperatura, pH e umidade do solo. Algumas espécies desse filo possuem a temperatura ótima para desenvolvimento na faixa de 25 a 30°C, enquanto outras, como as termofílicas, desenvolvem-se melhor a uma temperatura de 50 a 60°C

(EDWARDS, 1993; BARKA *et al.*, 2016). Essa mesma diferença para temperaturas ótimas ocorre também com o pH, visto que boa parte delas crescem melhor em um pH neutro (entre 6 e 9), sendo exceções as linhagens de *Streptomyces* encontradas em solos ácidos (KIM *et al.*, 2003; BARKA *et al.*, 2016). Além disso, o filo desenvolve estilos de vida variados, como patógenos, fixadores de nitrogênio através de uma relação simbiótica, comensais de plantas e algumas bactérias que estão presentes no trato gastrointestinal (VENTURA *et al.*, 2007).

Dentre estes múltiplos ecossistemas, os manguezais atraem a atenção de indústrias e pesquisadores por apresentarem variáveis ambientais peculiares para determinadas espécies (nichos ecológicos), e por isso tornam-se uma fonte incomum para isolamento de actinomicetos produtores de novos metabólitos secundários (HUANG *et al.*, 2008; XU, 2011; AZMAN *et al.*, 2015; PRIYADARSHINI *et al.*, 2016).

Uma grande variedade de produtores de biossurfactantes pode ser encontrada dentre os microrganismos da ordem *Actinomycetales*. Enquanto alguns actinomicetos já passaram por estudos quanto à capacidade de produção de biossurfactantes, como os gêneros *Rhodococci sp.* e *Mycobacteria sp.*, estes microrganismos ainda são considerados como raros (KÜGLER *et al.*, 2015). O crescimento de actinomicetos ocorre de forma muito lenta, quando comparado com outros microrganismos. Por causa disso, a produção de biossurfactantes, embora comece rapidamente, só mostra um aumento considerável em fases mais avançadas de crescimento, como no começo de fases estacionárias (KHOPADE *et al.*, 2012).

As linhagens da ordem *Actinomycetales* produzem metabólitos primários e secundários. Os metabólitos secundários são produtos metabólicos não essenciais para o crescimento e desenvolvimento do organismo produtor. Esses metabólitos são considerados compostos diferentes por conferirem vias adaptativas ao funcionar como mecanismos para defesa, adaptação frente ao ambiente e moléculas de sinalização em interações ecológicas. Sua síntese está relacionada às condições proporcionadas pelo meio (ADEGBOYE e BABALOLA, 2013).

Os metabólitos biologicamente ativos, produzidos secundariamente, exibem uma estrutura química única, possuem baixa massa molecular e um espectro diverso e versátil de efeitos biológicos proporcionados. São exemplos dessa versatilidade a ação antibiótica, antifúngica, antiviral, anticancerígena, imunossupressora, antitumoral e citotóxica (SOLECKA *et al.*, 2012; RAJAN e KANNABIRAN, 2014). Assim, ao isolar actinomicetos de ecossistemas

pouco estudados será possível atenuar o redescobrimto de metabólitos secundários (AZMAN *et al.*, 2015).

3.3 Moléculas Surfactantes

Surfactantes são constituídos por moléculas anfipáticas que dispõem de uma região hidrofílica (denominada “cabeça”) e outra hidrofóbica (denominada “cauda”) (Figura 1). Eles estão aptos a agregar-se nas interfaces entre as fases aquosas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/ar), uma polar e outra apolar, respectivamente. Sua presença nessas interfaces resulta na diminuição das forças de coesão na superfície do solvente (DE *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2016).

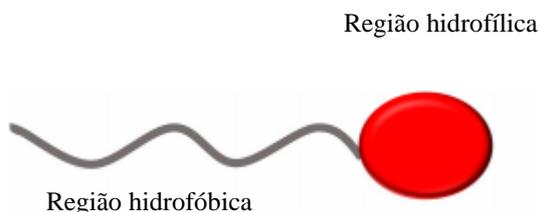


Figura 1: A cauda corresponde à porção apolar (hidrofóbica) e a cabeça à porção polar (hidrofílica) (SANTOS *et al.*, 2016).

A molécula apolar é frequentemente formada por uma cadeia de hidrocarbonetos linear ou ramificados, apresentando grupos aromáticos ou policíclicos, e possui baixa solubilidade em água. A porção polar apresenta muitas variações, podendo ser iônica (catiônica e aniônica), não iônica ou anfótera, de acordo com a carga exibida pela porção polar da molécula, sendo as não iônicas mais comumente conhecidas (BANAT *et al.*, 2000; CHRISTOFI e IVSHINA, 2002; BUSTAMANTE *et al.*, 2012). Essas moléculas formam um filme, que se ordena nas interfaces, sendo responsáveis por propriedades únicas dos surfactantes: detergência, emulsificação, lubrificação, formação de espuma, umidificação, solubilização e dispersão de fases (NITSCHKE e PASTORE, 2002; DEEPIKA *et al.*, 2016).

A região hidrofóbica tende a concentrar-se nas interfaces ar/água ou no centro de micelas (núcleo), reduzindo a tensão superficial da solução, e o grupo hidrofílico proporciona proteção do núcleo separando-o do solvente polar (MANIASSO, 2001; CHRISTOFI e IVSHINA, 2002). Em altas concentrações de surfactantes ocorre a aproximação dessas moléculas à interface, resultando em uma agregação (100 nm de diâmetro) através da formação de estruturas supramoleculares, conhecidas como micelas (Figura 2) (TANG *et al.*, 2013).

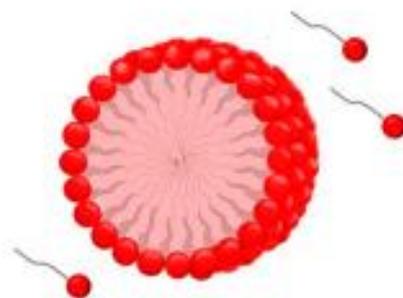


Figura 2: Ilustração dos agentes tensoativo e formação de micelas (SANTOS *et al.*, 2016).

As micelas surgem quando a parte lipofílica da molécula for incapaz de formar ligações de hidrogênio numa fase aquosa, provocando um aumento na energia livre do sistema. Este fato ocorre com o aumento da concentração de surfactante no meio, até atingir um valor crítico no qual a interface entre as fases encontra-se saturada (Figura 3). Esse ponto, conhecido como concentração micelar crítica (CMC), depende da queda das tensões interfaciais (indica o limite entre as duas fases imiscíveis) e superficiais (interface entre a fase líquida e a fase gasosa) até o princípio da agregação coloidal (COLLA e COSTA, 2003; DE *et al.*, 2015)

Além das micelas, outras formas de agregação incluem as vesículas esféricas ou irregulares e estruturas lamelares (monocamada e bicamada), sendo estas as estruturas básicas. As micelas são capazes de dissolver contaminantes hidrofóbicos no seu núcleo hidrofóbico, assim a região hidrofílica da micela encontra-se direcionada para dentro do núcleo e a região hidrofóbica para fora, resultando em um aumento da solubilidade aquosa aparente dos poluentes (COLLA e COSTA, 2003; BUSTAMANTE *et al.*, 2012).

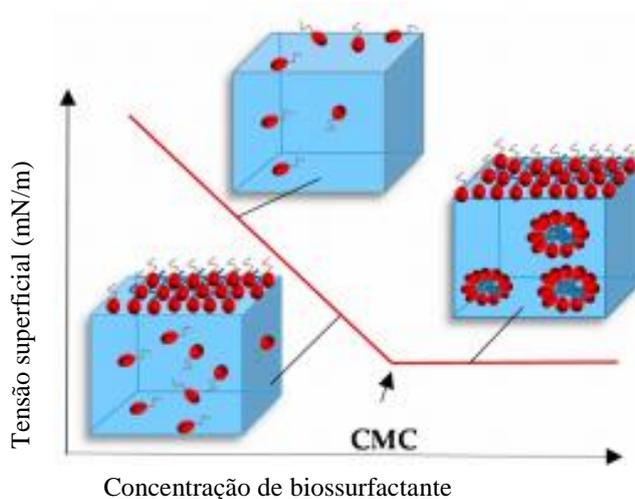


Figura 3: Esquema da relação entre concentração micelar crítica dos biossurfactantes e formação de micela (DE *et al.*, 2015).

A partir da adição destes tensoativos, ocorre a redução da tensão interfacial, o aumento da emulsificação dos contaminantes hidrofóbicos, a melhoria da solubilidade do hidrocarboneto e, por conseguinte, o aumento da biodisponibilidade de poluentes hidrofóbicos (SAJNA *et al.*, 2015).

Surfactantes e emulsionantes são componentes indispensáveis da vida diária, podendo ser sintéticos ou biológicos (MOUAFI *et al.*, 2016). A maioria dos sintetizados quimicamente é de origem petrolífera, tóxicos para o ecossistema, não são facilmente biodegradáveis, e os processos de fabricação dos seus produtos podem ser perigosos para o ambiente. Enquanto os biológicos são mais eficazes, possuindo o benefício de ser biodegradável, não oferecem danos ao meio ambiente (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002; PEREIRA *et al.*, 2010; MOUAFI *et al.*, 2016).

3.3.1 Surfactantes sintéticos

Os surfactantes sintéticos são classificados pela sua aplicação, estrutura molecular e natureza do seu grupo polar (BANAT *et al.*, 2000). Um exemplo comum de molécula surfactante sintética é a Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), de natureza anfipática (parcialmente hidrofílica e parcialmente hidrofóbica). Estas moléculas de tensoativo podem agregar em várias estruturas de solução, incluindo micelas e vesículas. Pode-se controlar a estrutura da solução mediante a adaptação das dimensões relativas dos segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos. Portanto, ao sintetizar as moléculas surfactantes alterando a concentração crítica de micelas, modifica a estrutura da solução (BASS *et al.*, 2015). A Tabela 2 representa a fórmula molecular e a nomenclatura correspondente.

Tabela 2: Fórmula molecular de alguns tipos de surfactantes sintéticos

Tipo	Agente Surfactante	Fórmula molecular
Catiônicos	Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$
	Brometo de dodecetiltrimetil amônio (DTAB)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$
Aniônicos	Cloreto de cetilpiridino	$\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{ClN}^+$
	Dodecil sulfato sódico (SDS)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4^-\text{Na}^+$
	Bis (2-etilhexil) sulfosuccinato sódico (Aerosol OT)	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_2\text{OCO}]_2\text{CHSO}_3^-\text{Na}^+$
Não iônicos	Dihexadecil fosfato (DHF)	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{O}]_2\text{PO}_2^-$
	Polioxi-etileno (9-10) p-tercotil fenol (Triton X-100)	$(\text{CH}_3)_3\text{C}(\text{CH}_2)\text{C}(\text{CH}_3)_2(\text{Ar})(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{23}\text{OH}$

Continuação Tabela 2

Tipo	Agente Surfactante	Fórmula molecular
Não iônicos	Polioxi-etileno (23) dodecanol (brij 35)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{23}\text{OH}$
Anfóteros	3-(dodecildimetil amônio) propano 1-sulfato (SB-12)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_3\text{OSO}_3^-$
	4- (dodecildimetil amônio) Obutirato (DAB)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_3\text{COO}^-$

Fonte: MANIASSO, 2001.

A biodisponibilidade e a cinética de biodegradação dos poluentes hidrofóbicos são afetadas pela variável dos tensoativos. Ambos os efeitos estimulantes e inibidores dos agentes tensoativos são utilizados na biorremediação de poluentes dependendo das características químicas do surfactante (SINGH *et al.*, 2007). Surfactantes podem aumentar a solubilidade de óleos em água para melhorar a biodisponibilidade dos substratos hidrófobos, levando a altas taxas de degradação do petróleo. Todavia, surfactantes sintéticos não são apropriados para aplicações em biorremediação, pois são dificilmente biodegradáveis e têm uma influência negativa para o meio ambiente (WEI *et al.*, 2005).

Estes surfactantes apresentam como vantagem o baixo custo de produção em substratos puros, eles vêm sendo usados como alternativa emergencial, por exemplo, no derramamento de óleo da plataforma Deepwater Horizon (sonda petrolífera, localizada no Golfo do México), onde foram aplicados mais de 990.000 galões de dispersantes na superfície da água e na cabeça do poço (BARROS *et al.*, 2007; HALLMANN e MEDRZYCKA, 2015; PI *et al.*, 2017).

Ao despejar estes compostos na água como uma ação de limpeza, a redução da tensão superficial diminui a taxa de evaporação, além de aumentar a solubilidade de compostos orgânicos existentes nos cursos d'água. Simultaneamente, a utilização desse tensoativo resulta na formação de uma camada de espuma na superfície da água, responsável por impedir a penetração dos raios solares, reduzindo a solubilidade do oxigênio e causando a morte de organismos vivos (COSTA *et al.*, 2007; OLKOWSKA *et al.*, 2014).

Nos países industrializados, 70-75% dos surfactantes consumidos são de origem petroquímica, enquanto que nos países em desenvolvimento predominam os de origem natural. Entretanto, nos países industrializados existe uma tendência para a substituição dos surfactantes sintéticos pelos biológicos, movida pela necessidade de produtos mais brandos substituir os compostos não biodegradáveis (alquil benzenos ramificados) (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

3.3.2 Surfactantes biológicos

Os surfactantes de origem microbiana consistem em um grupo heterogêneo de moléculas de superfície ativa com propriedades tensoativas, produzidos por microrganismos (leveduras, fungos e bactérias) ou plantas (LIU *et al.*, 2016). Eles também podem ser chamados de biosurfactantes. Estes compostos são superiores aos agentes tensoativos sintéticos devido a sua baixa toxicidade, melhor compatibilidade ambiental, capacidade elevada de formação de espuma, elevadas especificidade e estabilidade em diferentes temperaturas, pH e salinidade, e são biodegradáveis, assim esses compostos são menos poluentes que os sintéticos (ARAUJO *et al.*, 2013; ADAMU *et al.*, 2015; DEEPIKA *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2016)

A tensão superficial pode ser definida como a entalpia livre por unidade de área necessária para trazer uma molécula da fase interna para a superfície. Os surfactantes ficam concentrados nas interfaces (sólido-líquido, líquido-líquido ou líquido-vapor) (CHRISTOFI e IVSHINA, 2002; MULLIGAN, 2005).

A produção de biosurfactantes pode ser espontânea ou ser induzida pela presença de compostos lipofílicos, variações de pH e temperatura, aeração e velocidade de agitação. Muitos biosurfactantes podem ser aplicados em altas temperaturas e com variação de pH de 2 a 12. Eles suportam uma concentração de sal de até 10%, enquanto surfactantes sintéticos são inativados a um NaCl de 2% (SANTOS *et al.*, 2016).

Os termos biosurfactante e bioemulsificante (elevado peso molecular) são frequentemente utilizados para descrever biomoléculas, que podem ser neutras ou aniônicas (SANTOS *et al.*, 2016), variando desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros. No entanto, é importante ressaltar que há diferenças entre eles, como em suas propriedades físico-químicas, mesmo ambos possuindo natureza anfipática e sendo produzidos por microrganismos. Biosurfactantes são caracterizados por serem produtos de baixo peso molecular e excelente atividade superficial, que envolve a redução da superfície e a tensão interfacial entre diferentes fases, portanto possui uma baixa concentração crítica da micela (CMC) e forma emulsões estáveis. Eles são compostos por açúcares, aminoácidos, ácidos graxos e grupos funcionais, tais como os ácidos carboxílicos. Os grupos são classificados em: glicolipídios, lipopeptídeos e fosfolipídios (MARCHANT e BANAT, 2012; UZOIGWE *et al.*, 2015; DEEPIKA *et al.*, 2016; VIGNESHWARAN *et al.*, 2016).

Já os bioemulsificantes apresentam peso molecular mais elevado, e são formados por uma mistura complexa de heteropolissacáridios, lipopolissacarídeos, proteínas e lipoproteínas. Estas moléculas estabilizam emulsões de dois líquidos imiscíveis, tais como hidrocarbonetos ou outros substratos hidrófobos, mesmo em baixas concentrações, mas são menos eficazes na redução da tensão superficial (MARCHANT e BANAT, 2012; UZOIGWE *et al.*, 2015; DEEPIKA *et al.*, 2016; VIGNESHWARAN *et al.*, 2016). Emulsificação pode ser definida como a dispersão de um líquido em outro como gotículas microscópicas, levando à mistura de dois líquidos imiscíveis (DE *et al.*, 2015).

3.3.2.1 Caracterização dos surfactantes biológicos

Glicolipídios possuem carboidratos ligados a uma longa cadeia alifática ou lipopeptídica, sendo os mais populares entre os biosurfactantes aqueles produzidos pela estirpe de *Pseudomonas* (DEEPIKA *et al.*, 2016), por apresentar menor toxicidade entre as classes. Estruturalmente, são constituídos por um ácido graxo em combinação com uma porção de hidrato de carbono e correspondem a um grupo de compostos que diferem pela natureza da porção do hidrato. Dependendo da fonte de carbono utilizada para produção de biosurfactantes os glicolipídios podem ser de diferentes classes, sendo subdivididas em ramnolipídios, soforolipídios e os trealoselipídios (Figura 4) (HOLMBERG, 2001; INÈS e DHOUHA, 2015). Dentre essas classes, segundo ARAUJO *et al.* (2013) os ramnolipídios vêm sendo mais estudados, por apresentarem características aniônicas quando em solução, e possuem uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico.

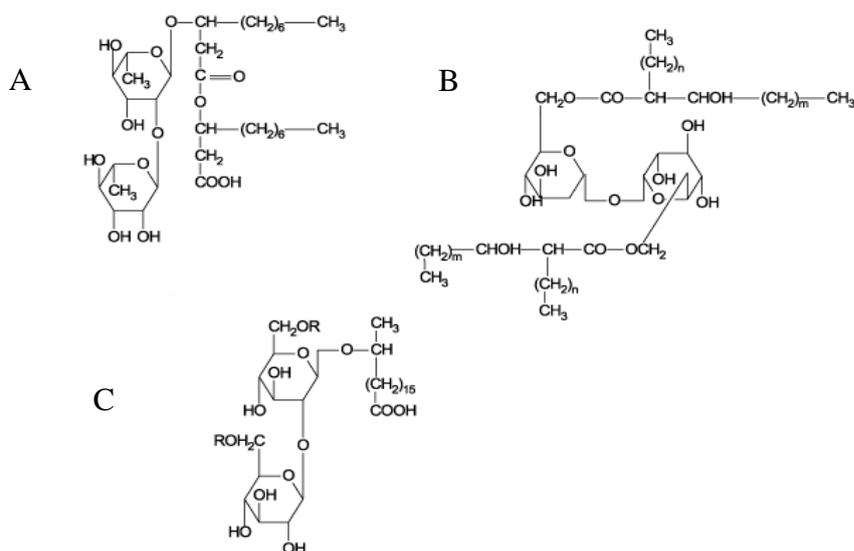


Figura 4: Subclasses e estruturas químicas de glicolipídios; a) ramnolipídios; b) trealoselipídios; c) soforolipídios (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Os lipopeptídios são surfactantes aniônicos, com capacidade de reduzir a tensão superficial de 72 para 27,9 mN/m em concentrações de apenas 0,005%, sendo produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*, especialmente os *Bacillus subtilis*. Constituídos por um peptídeo (porção hidrofílica) composto por porção de aminoácidos (Glu – Leu – Leu – Val – Asp – Leu – Leu) ligada a um ácido graxo (porção hidrofóbica), contendo de 13 a 15 carbonos (BARROS *et al.*, 2007; ARAUJO *et al.*, 2013). O representante mais conhecido dentre os lipopeptídios é a surfactina (Figura 5), extensivamente relacionada como subproduto metabólico do gênero *Bacillus*. As surfactinas são classificadas em três tipos diferentes (A, B e C) de acordo com as suas sequências de aminoácidos. Podem ser aplicadas em vários setores, tais como farmacêuticos, inibindo a formação de coágulos; formação de canais iônicos em membranas; atividade antimicrobiana; atividade antiviral e antitumoral. (ARAUJO *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2013; FOOLADI *et al.*, 2016).

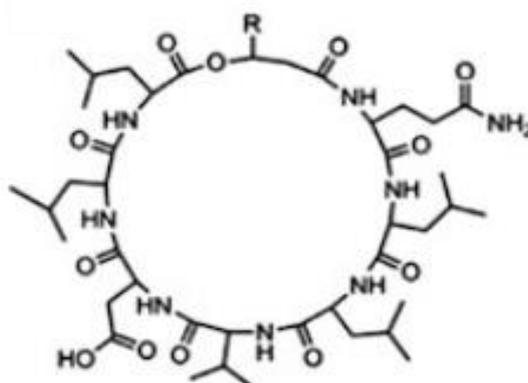


Figura 5: Estrutura da surfactina, surfactante lipopeptídico (JOY *et al.*, 2017).

Os fosfolipídios (Figura 6) são os principais componentes das membranas celulares. Estão envolvidos de várias formas na interação das proteínas a membrana. As moléculas dos lipídios neutros e ácidos graxos podem apresentar atividade de superfície ativa (LEENHOUTS *et al.*, 1995). São capazes de formar microemulsões e diminuir a tensão superficial entre o hexadecano e a água. Algumas bactérias ou leveduras, em meio rico de hidrocarbonetos alifáticos aumentaram seus níveis de fosfolipídios consideravelmente (BANAT *et al.*, 2000). Um exemplo comum de microrganismos biosurfactantes fosfolipídico é o *Corynebacterium lepus* (SOBRINHO *et al.*, 2014).

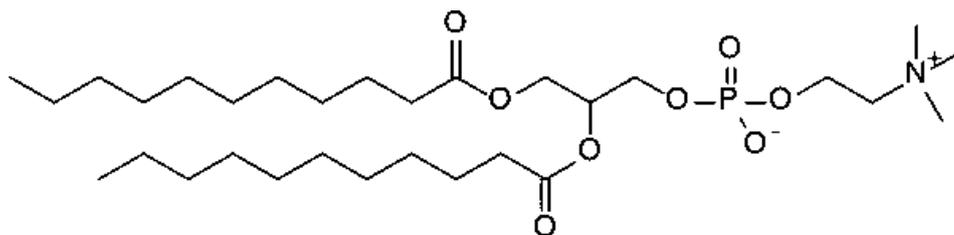


Figura 6: Estrutura do fosfolipídio (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Em relação aos biossurfactantes de elevado peso molecular (bioemulsificante), estes formam uma mistura complexa de heteropolissacáridos, lipopolissacarídeos, proteínas e complexos de biopolímero (LIU *et al.*, 2016). Os biossurfactantes poliméricos são compostos que contêm carboidratos, proteínas, lipídios, formados por vários grupos químicos diferentes, como o *emulsan* produzido pela *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 (Figura 7). Este possui um peso molecular de 1,000 kDa, o qual ácidos graxos estão ligados a um esqueleto de heteropolissacarídeos. A combinação de polissacarídeo, ácidos graxos e proteínas oferece melhor capacidade potencial para estabilizar emulsões. O *emulsan* na forma pura apresenta atividade emulsificante em concentrações baixas (0,001-0,01%) (GAKPE *et al.*, 2007), ele aumenta a biodisponibilidade de substratos em ambientes aquosos para o acesso a degradação microbiana do substrato hidrofóbico. No entanto, ele pode emulsionar misturas de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos em proporções equilibradas, mas não pode emulsionar as formas puras (NITSCHKE e PASTORE, 2002; UZOIGWE *et al.*, 2015). Na Tabela 3 são apresentados os tipos de biossurfactantes, os subgrupos, as classes e os seus respectivos microrganismos produtores.

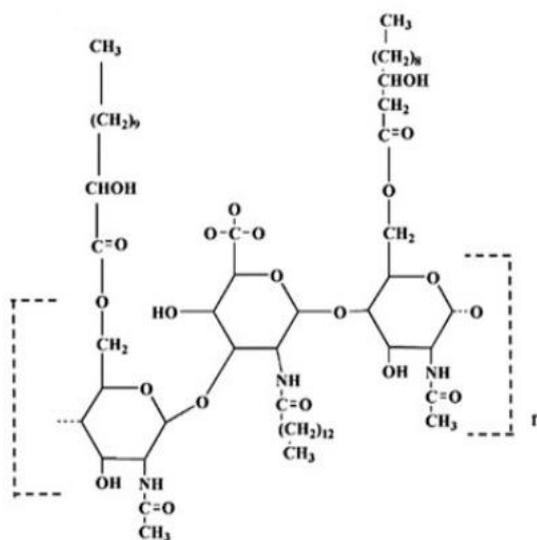


Figura 7: Estrutura química *emulsan* produzido pela *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 (JOY *et al.*, 2017).

Tabela 3: Principais tipos de biossurfactantes e seus respectivos subgrupos, classes e os microrganismos produtores.

Grupos	Subgrupos	Classes	Microrganismos
Biossurfactante (baixo peso molecular)	Glicolipídios	Ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas sp. DMS 2847</i>
		Soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i> , <i>Candida bombicola</i> , <i>Candida apicola</i> , <i>Torulopsis petrophilum</i>
		Trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Arthobacter sp.</i>
		Celobiolipídios	<i>Ustilago maydis</i> , <i>U. zeae</i> ,
		Mannosylerythritol lipídios	<i>Candida antártica</i>
	Lipopeptídios e lipoproteínas	Peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
		Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
		Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
		Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
		Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
		Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
		Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
		Lichenisyn	<i>Bacillus licheniformis</i>
	Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios	Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
		Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i> , <i>Corynebacterium salvonicum SFC</i>
Fosfolipídios		<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	
Ácidos corinomicólicos		<i>Corynebacterium insidibasseosum</i>	
Bioemulsificante (elevado peso molecular)	Surfactantes poliméricos	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
		Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
		Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
		Carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Surfactantes particulados	Manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
		Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
		Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
		Células	<i>Cyanobacteria</i>

Fonte: KOSARIC, 2001; NITSCHKE e PASTORE, 2002; NITSCHKE e COSTA, 2007; DE *et al.*, 2015.

3.4 Aplicação

Os biossurfactantes possuem ampla diversidade química com propriedades para aplicações específicas em campos variados, como a indústria de cosméticos, produtos farmacêuticos, indústrias alimentícias e de bebidas, agricultura, produtos de limpeza, produtos químicos especiais, metal, papel, biorremediação de poluentes insolúveis em água, têxtil e indústrias de petroquímicos e petróleo (Tabela 4) (BARROS *et al.*, 2007; ARAUJO *et al.*, 2013).

Esta diversidade de aplicações é fruto de características acentuadas dos surfactantes, como biodegradabilidade, baixa toxicidade e funcionalidade em condições adversas (SILVA *et al.*, 2014). A redução da tensão superficial causada pelos biossurfactantes permite sua utilização nas mais variadas áreas. Na agricultura, por exemplo, é possível a melhoria da absorção de água e nutrientes por parte dos vegetais, através da redução da zona seca que ocorre em solos arenosos (MAO *et al.*, 2015).

Tabela 4: Aplicações dos biossurfactantes.

	Uso	Aplicação
Metais	Concentração de minérios	Hidratação e formação de espuma e coletores
	Corte e forma	Hidratação, emulsificação, lubrificação e inibição de corrosão em óleos
Fundição	Remoção de ferrugem e escamas	Aditivos removedores de mofo
	Chapeamento	Desoxidação e limpeza eletrolítica
		Hidratação e formação de espuma em chapeamento eletrolítico
Papel	Tratamento de polpa	Limpeza
	Máquinas de papel	Antiespumante, nivelamento de cores, e dispersão
		Hidratação e nivelamento, revestimento e coloração
Tintas e revestimentos protetores	Preparação de pigmentos	Dispersão e hidratação de pigmento durante a quebra da emulsão, estabilização de látex
	Tintas látex	Retardamento de pigmentação e <i>separação</i> de pigmentos, reologia
Ceras e polimentos		Emulsionar ceras, estabilização de emulsões
Produtos à base de petróleo	Fluidos de perfuração	Emulsionar óleos, dispersão de sólidos, modificar propriedades reológicas de fluidos de perfuração para poços de gás e petróleo
Extração de petróleo	Poços de petróleo	Emulsionar e despargir lodo e sedimentos em limpeza de poços

Continuação Tabela 4

	Uso	Aplicação
Extração de petróleo	Recuperação secundária	Desemulsificar petróleo bruto, inibir a corrosão de equipamentos
	Produtos refinados	Operações em locais alagados, hidratação preferencial
		Detergente de lodo dispersante e inibidor de corrosão em óleos combustíveis, <i>cranckcase oils</i> e óleos de turbina.
Têxteis	Preparação de fibras	Limpar e emulsionar durante o armazenamento de lã bruta.
	Descoloração e impressão	Lubrificação na rotação de filamentos hidrofóbicos
	Finalização	Hidratação, penetração, solubilização, emulsão, nivelamento de descoloração, dispersão
		Hidratação e emulsão em formulações finais e lubrificação
Agricultura	Fertilizantes à base de fosfato	Prevenir solidificação durante armazenamento
	Aplicação de spray	Hidratação, dispersão, suspensão de pesticidas em pó e emulsão de pesticidas
		Promoção de hidratação, espalhamento e penetração de tóxicos
Construções	Pavimentação	Promover a interação asfalto-brita-areia
	Concretagem	Promover aeração
Elastômeros e plásticos	Polimerização de emulsões	Solubilizar e emulsionar monômeros
	Polímeros espuma	Introdução de ar, controle do tamanho celular
	Adesão de látex	Promover hidratação, melhorar a força das ligações
	Artigos plásticos	Agentes hidratantes
	Revestimento de plásticos	Agentes para banho
Alimentos e bebidas	Plantas de processamentos alimentícios	Limpeza
	Frutas e vegetais	Melhoria da remoção de pesticidas, enceramento
	Panificações e sorveterias	Solubilizar óleos gastronômicos, controlar consistência,
	Cristalização de açúcar	Melhorar limpeza, reduzir tempo de processamento
Limpeza industrial	Cozimento de óleos e gorduras	Prevenir respingos devido a superaquecimentos
	Suprimentos de limpeza	Detergentes e desinfetantes
	Descalcificação	Agentes hidratantes e inibidores e corrosão em limpeza com ácidos de tubos quentes
Couro		Detergentes para limpeza e "dry cleaning"
	Peles	Emulsionar em desengorduramentos
	Oclusão	Emulsão em engraxamentos
	Descoloração	Promover hidratação e penetração

Fonte: KOSARIC, 2001.

Na literatura relata-se que a utilização mais satisfatória dos biossurfactantes, buscando a maior eficiência possível, é interessante combinar surfactantes sintéticos com os de origem biológica. O híbrido de surfactantes iônicos e aniônicos tende a prover uma solubilização superior quando comparada ao uso de apenas um dos tipos (PARIA, 2008).

Dentre as múltiplas aplicações dos biossurfactantes, destaca-se o uso nas indústrias petrolíferas, utilizando-os na biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção do resíduo de óleo a partir de tanques de estocagem, e a recuperação melhorada de petróleo (MEOR) (NITSCHKE e PASTORE, 2002; SOBRINHO *et al.*, 2014). O MEOR é uma técnica de recuperação terciária que recupera o óleo residual usando microrganismos, bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* (subclasse, ramnolipídio), *Rhodococcus sp.* (trealoselipídio) e *Bacillus subtilis* (lipopeptídeo), conhecidas pela sua eficiência na produção dos biossurfactantes. Elas atuam reduzindo a tensão superficial da água e a tensão interfacial do sistema água/óleo significativamente, mesmo em baixa concentração (BARROS *et al.*, 2007; XIA *et al.*, 2011).

De acordo com SILVA *et al.* (2014) os biossurfactantes são usados em diversas etapas dos processos industriais envolvendo o petróleo. Algumas aplicações são relacionadas a funções mais específicas, como redução da viscosidade do petróleo, controle de deposição do asfalto, estabilização de lama de perfuração, estabilização de emulsão de petróleo, emulsão de lodo e dispersão de hidrocarbonetos.

SOBRINHO *et al.* (2008) estudaram surfactantes produzidos pela bactéria *Candida sphaerica* aplicados em óleo de motor para avaliar o seu potencial de remoção deste contaminante. Quando aplicados em argilas ou em água do mar, a taxa de remoção do óleo resultou em 75%. Já quando aplicados em siltes, esta taxa atingiu 92% de remoção, demonstrando o potencial de biossurfactantes em processos biotecnológicos para descontaminação ambiental.

O derramamento do óleo bruto, ocasionalmente, ocorre durante o descarte de resíduos de petróleo em instalações de armazenamento, exploração, transporte e processamento. Esses vazamentos levam a uma séria contaminação do solo, resultando muitas vezes em danos ambientais imediatos ou a longo prazo (WANG *et al.*, 2012a ; SAN KESKIN *et al.*, 2015). Os métodos biológicos, quando comparados com os físico-químicos, ganharam maior aceitação na limpeza dos locais contaminados, por sua vez, considerada mais benéfica e de baixo impacto ambiental, sendo biodegradável (WANG *et al.*, 2012b; CAI *et al.*, 2014; CHANDANKERE *et al.*, 2014).

O petróleo cru é um composto complexo com baixa biodisponibilidade, normalmente formado por hidrocarbonetos (constituído por carbonos e hidrogênios em diferentes estruturas).

Também podem apresentar pequenas quantidade de átomos, tais como enxofre, nitrogênio, metais e oxigênio presentes nas frações polares do petróleo bruto. Essas características podem variar, conforme a região produtora (WANG *et al.*, 2012b; TOMREN e BARTH, 2014).

Suas propriedades físicas podem mudar de acordo com os tipos de componentes, podendo ser divididas em duas classes: hidrocarbonetos e não hidrocarbonetos. Os hidrocarbonetos podem ser classificados como saturados, insaturados e aromáticos, tais como alcanos (parafinas), ciclo alcanos (naftênicos) e componentes aromáticos. Os não hidrocarbonetos são considerados impurezas, como por exemplo resinas, asfalteno, compostos nitrogenados, oxigenados, sulfurados e metálicos. Os principais grupos que compõe o petróleo são os hidrocarbonetos aromáticos, saturados, as resinas e os asfaltenos. A Tabela 5 apresenta a composição de um petróleo típico (THOMAS, 2004; ARTOLA *et al.*, 2011).

Tabela 5: Composição química típica do petróleo.

Propriedade	Valor
Parafinas normais	14%
Parafinas ramificadas	16%
Parafinas cíclicas (naftênicas)	30%
Aromáticos	30%
Resinas e asfaltenos	10%

Fonte: THOMAS, 2004.

Na composição do petróleo é possível encontrar diversas substâncias tóxicas, como benzeno, etilbenzeno, tolueno e xileno (componentes aromáticos alifáticos nocivos à saúde humana) (Figura 8). Para neutralizar esses componentes, a técnica da biorremediação é utilizada como solução. Neste processo, as bactérias fazem uso destes compostos como fonte de carbono e energia durante o seu metabolismo. As bactérias do gênero *Acinetobacter sp.* são exemplos de microrganismos capazes de realizar este processo (BAO *et al.*, 2014).



Figura 8: Estrutura molecular do tolueno, benzeno e orto-xileno.

Cerca de 60 a 90% dos componentes do petróleo é biodegradável. Todavia, uma fração de 10 a 40% (em estado bruto ou refinado) é recalcitrante, resultando em compostos mais resistentes. Tanto as bactérias quanto os fungos dependem da ação de diferentes enzimas (intracelulares e extracelulares, respectivamente), para realizar a remediação (MARIA *et al.*, 2010; KARIGAR e RAO, 2011). Os biossurfactantes vão agir estimulando a redução da viscosidade e a formação de emulsões O/A (fase interna oleosa e fase externa aquosa), possibilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru após quebra da emulsão. Os sólidos resultantes portam uma quantidade limitada de óleo residual pela ação de limpeza, tornando o descarte destes resíduos menos danoso (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

A biodegradação pode ser inibida através de interações tóxicas e retiradas de hidrocarbonetos em micelas de tensoativas. A toxicidade de qualquer surfactante está relacionada com a sua capacidade de adsorver e adentrar na célula através da membrana celular bacteriana. Assim ocorrendo por qualquer dos dois mecanismos, tais como, ruptura da membrana celular pela interação com os lipídeos da membrana, e interação de surfactantes com moléculas de proteína essenciais para o funcionamento celular. Logo, os compostos ativos de superfície microbianos tem sua toxicidade reduzida, ocorrendo a biodegradabilidade (MNIF *et al.*, 2017).

Biorremediação é um dos métodos biológicos, que apresenta maior eficácia da biodegradação microbiana. Os organismos vivos têm capacidade para transformar ou degradar os contaminantes atacando enzimaticamente os poluentes e os convertendo em substâncias menos nocivas que podem ser integrados no ciclo bioquímico natural. No entanto, seu processo é muito lento e somente poucas espécies de microrganismos são eficazes quando dispostas no meio ambiente. Essa problemática está relacionada pela limitação do crescimento bacteriano que sofre influência de fatores como oxigênio, pH, temperatura, umidade, presença de macronutrientes e micronutrientes. (KARIGAR e RAO, 2011; SOBRINHO *et al.*, 2014)

Na busca por alternativas menos prejudiciais ao meio ambiente, propícios de ser produzidas a partir de matérias primas renováveis, grupos de pesquisa trabalham para viabilizar a produção de moléculas de origem biológica. Pesquisas essas tem como alvo desenvolver técnicas para acelerar o processo de descontaminação com menor custo e diminuir o dano ambiental (MARIA *et al.*, 2010).

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Região da coleta

Com a finalidade de fornecer microrganismos distintos e de interesse ao estudo foram selecionadas duas áreas tipicamente diferentes quanto à modificação do ecossistema. Os pontos coletados estão situados nas margens do Rio Sergipe, principal curso hídrico da bacia hidrográfica de mesmo nome. Este rio tem grande importância devido ao fato de cruzar a capital sergipana e contribuir com diversos fatores da sociedade. A Figura 9 está representado o mapa do Brasil e onde está localizado o estado de Sergipe no mesmo.

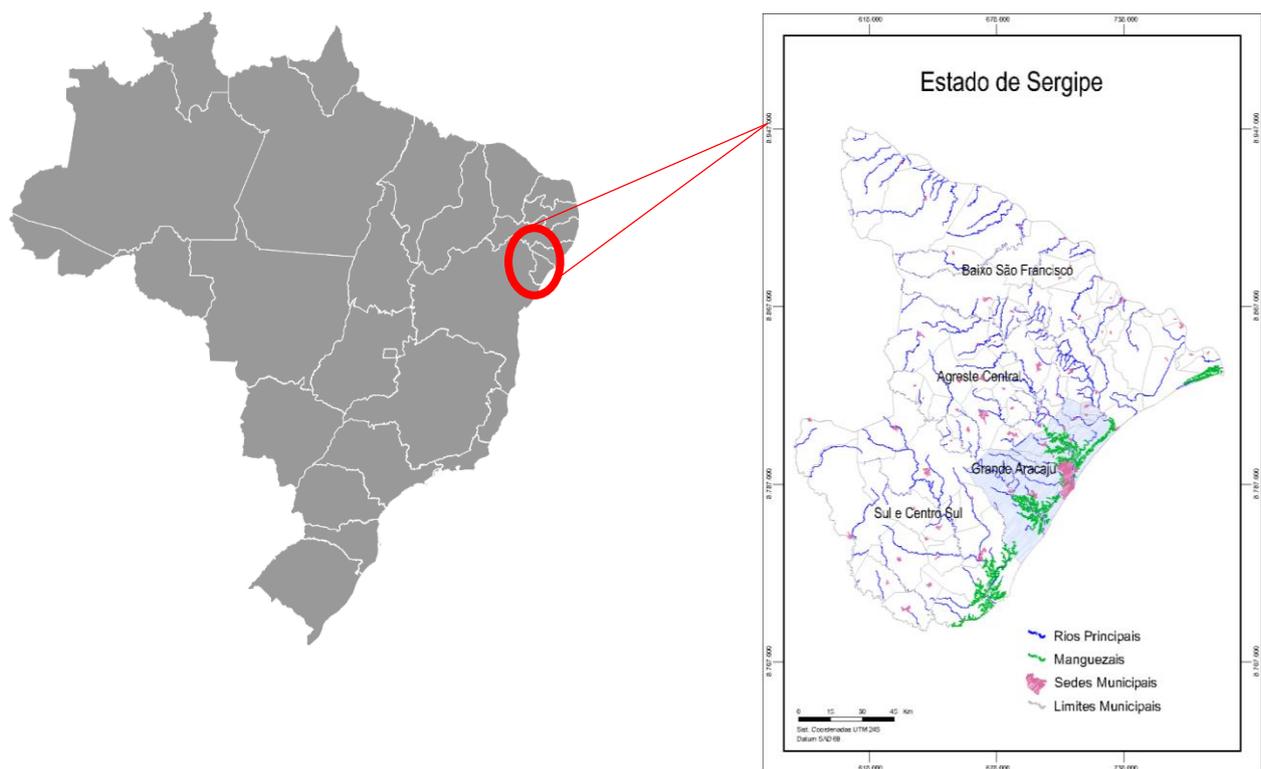


Figura 9: Mapa representando o Estado de Sergipe no território nacional, bem como suas sub-regiões, os principais rios e os manguezais.

4.2 Coleta de amostras do solo do mangue

As coletas do solo foram realizadas em um local não impactado e em outro com interferência antrópica. A primeira coleta foi executada no dia 21 de setembro de 2016, próximo ao povoado Porto das Cabras, localizado no município da Barra dos Coqueiros - Sergipe ($10^{\circ}49'00.38''\text{S}$, $36^{\circ}57'27.50''\text{W}$). Nesta área o manguezal não apresentava indícios de impacto referente ao descarte de efluentes (Figura 10). No dia 05 de dezembro 2016 realizou-se a segunda coleta no manguezal da Praia Formosa, localizado no bairro 13 de julho no município de Aracaju ($10^{\circ}55'53.244''\text{S}$, $37^{\circ}2'47.544''\text{W}$). Esta área consiste em um ambiente urbano em que há um descarte de efluentes domésticos não tratados no ponto de contato entre o canal de drenagem e o rio, resultando em um ambiente impactado (Figura 11).

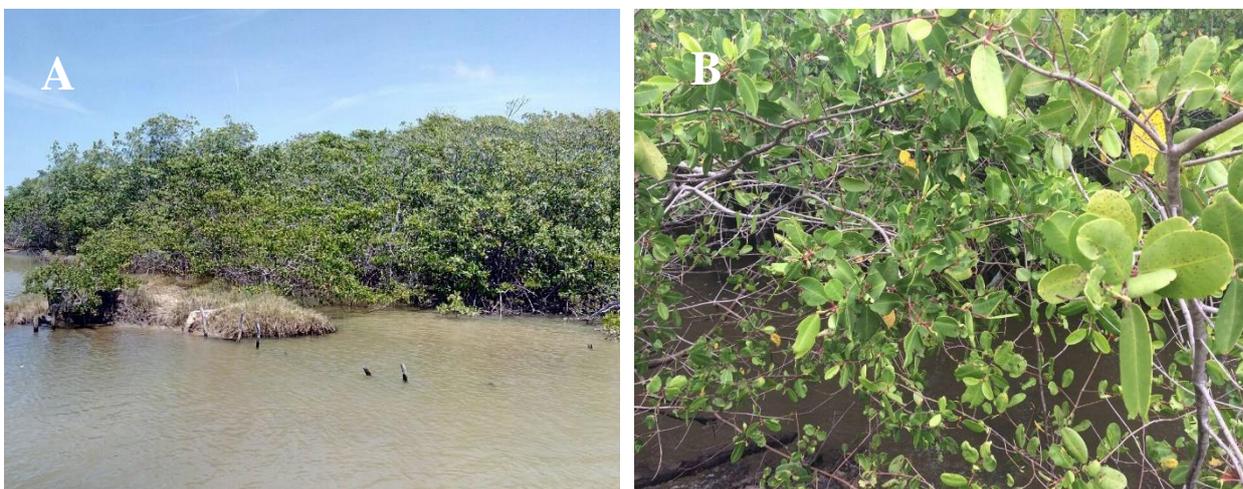


Figura 10: Manguezal próximo ao Povoado Porto das Cabras localizado no município Barra dos Coqueiros-SE. a) ecossistema sem ação antrópica; b) vegetação característica do manguezal.



Figura 11: Manguezal da praia Formosa localizada no bairro 13 de julho. a) lançamento de efluentes no curso hídrico; b) vegetação remanescente do manguezal.

Em ambas as coletas, o solo do mangue foi removido distanciando 10 m de cada ponto de coleta com o auxílio de uma bomba de sucção fabricada com cano de PVC, uma ferramenta usada por pescadores. As amostras do solo foram removidas a ± 10 cm da superfície do solo (aproximadamente 100 g por amostra) e foram depositadas no interior de tubos tipo *Falcon* previamente esterilizados. Foram então transferidas para o Laboratório de Biomateriais (LBMAT) localizado no Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) presente na Universidade Tiradentes (UNIT), onde foram mantidas sob refrigeração, até sua utilização. As coletas do município de Porto das Cabras foram extraídas em 10 pontos distintos (Figura 12 e Tabela 6), enquanto as do bairro 13 de julho foram retiradas em 12 pontos (Figura 13 e Tabela 7).



Figura 12: Pontos das coletas realizadas no município da Barra dos Coqueiros. Imagem de Satélite obtida através do Google Maps.



Figura 13: Pontos das coletas realizadas no bairro 13 de julho da cidade de Aracaju Imagem de Satélite obtida através do Google Maps.

Tabela 6: Ponto de coleta, geolocalização e massa das amostras de sedimento do manguezal localizado no Povoado Porto das Cabras, município de Barra dos Coqueiros/SE.

Referências no mapa	Ponto	Coordenadas Geográficas S	Coordenadas Geográficas W	Massa (g)
1	1	10°49'00.38"	36°57'27.50"	103
2	2	10°49'00.08"	36°57'27.77"	103
3	3	10°48'59.79"	36°57'28.06"	97
4	4	10°48'59.54"	36°57'28.45"	95
5	5	10°48'59.26"	36°57'28.93"	109
6	6	10°48'57.95"	36°57'30.59"	98
7	7	10°48'57.02"	36°57'30.99"	105
8	8	10°49'02.11"	36°57'26.05"	110
9	9	10°49'00.56"	36°57'25.95"	104
10	10	10°49'01.09"	36°57'25.55"	115

Tabela 7: Pontos de coleta, geolocalização e massa das amostras de sedimento de manguezal da localizado no município de Aracaju/SE.

Referências no mapa	Ponto	Coordenadas Geográficas S	Coordenadas Geográficas W	Massa (g)
1	1	10°55'53.244"	37°2'47.544"	97
2	1.2	10°55'52.565"	37°2'44.423"	65
3	2	10°55'53.886"	37°2'43.097"	96
4	3	10°55'55.05"	37°2'40.709"	105
5	4	10°55'58.553"	37°2'44.976"	108
6	5	10°56'2.609"	37°2'46.728"	101
7	6	10°56'5.418"	37°2'47.106"	92
8	7	10°56'8.736"	37°2'47.676"	94
9	8	10°56'8.759"	37°2'47.525"	101
10	9	10°56'11.873"	37°2'50.346"	100
11	10	10°56'11.664"	37°2'49.769"	115
12	11	10°56'14.136"	37°2'47.879"	103

4.3 Isolamento dos Microrganismos

A partir da coleta das amostras do solo, realizou-se uma diluição de 4g de cada amostra em suspensão com 40 mL de solução salina (0,9%). A solução foi homogeneizada, com o auxílio de um vórtex (Kasvi, Produtos e Equipamentos para Laboratório, Paraná, Brasil). Desta diluição foram inoculadas alíquotas de 1 mL (em triplicata) em placa Petri, descartável e

previamente esterilizada (90x15 mm) contendo meio de cultivo seletivo *Actinomycetes Isolation Agar* (AIA) adaptado (HiMedia Leading BioSciences Company, Bombaim, India), com a seguinte composição (g/L): 0,1 (L-asparagina); 0,5 (K₂HPO₄); 0,001 (FeSO₄); 2 (Caseinato de Sódio); 0,1 MgSO₄.7H₂O; 4 (C₃H₅NaO₂) e ágar 15. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica de 5 a 14 dias a 28°C, sendo então transferidas para uma geladeira onde foram mantidas.

4.4 Caracterização bioquímica das bactérias

Para a caracterização dos isolados bacterianos, foram realizadas investigação de colorações (Gram) e testes para expressões da catalase, urease, oxidase, amilase e hemólise. Esses testes são baseados na atividade enzimática da célula bacteriana.

4.4.1. Coloração de Gram

A coloração de Gram é amplamente utilizada para categorizar as bactérias em Gram-positivas ou Gram-negativas. Tal compartimentalização deve-se tanto a composição da parede celular quanto a capacidade de retenção do complexo cristal violeta-iodo formado a partir da combinação do corante básico púrpura (solução corante de violeta genciana fenicada) e iodo (solução de lugol fraco) no citoplasma. Para realização dos testes foi utilizado o kit de coloração de Gram (Laborclin Produtos para Laboratório Ltda, Paraná, Brasil), de acordo com as prescrições do fabricante.

Uma alíquota de material bacteriano (0,01 mL) foi retirada do meio de cultivo *Actinomycetes Isolation Agar* utilizando uma alça bacteriológica descartável. O material foi espalhado sobre uma fina camada de água de injeção disposta em uma lâmina microscópica de vidro 26x76 mm de ponta fosca desengordurada e limpa e deixou-o secando ao ar. Promoveu-se a fixação do material utilizando um bico de *Bunsen* e deixou-o resfriando. Posterior ao resfriamento da lâmina, adicionou-se 1 mL de solução corante de violeta genciana fenicada (cód. LB 620517), esperando agir por 1 minuto. Após esse tempo, deixou-se a lâmina escorrendo sem lavar. Em seguida, o esfregaço foi coberto com 1 mL de solução de lugol fraco (cód. LB 620511), deixando agir por 1 minuto. A solução de lugol fraco (cód. LB 620511) foi removida ao gotejar a solução descolorante à base de álcool e acetona (cód. LB 621000) até o líquido tornar-se límpido (15-30 segundos). Banhou-se a lâmina com água corrente e adicionou-se 1 mL de solução corante de fucsina fenicada para Gram (cód. LB 620515), esperando agir

de 30 a 60 segundos. Posteriormente, lavou-se com água corrente, posicionando a lâmina verticalmente para secagem. Em seguida, foi avaliado no microscópio biológico binocular usando a objetiva de imersão 100x de aumento total. As células bacterianas que apresentaram cor roxa ou violeta foram consideradas Gram-positivas e aquelas que possuíam cor rosada ou avermelhada foram consideradas Gram-negativas.

4.4.2 Teste da Oxidase

A medida da capacidade oxidante é realizada através do uso de fitas reativas de oxidase (Interlab Distribuidora de Produtos Científicos, São Paulo, Brasil). Com o auxílio de alças bacteriológicas descartáveis, uma pequena quantidade das bactérias (entre 0,01 e 0,02 mL) foi emulsionada na superfície da fita, tendo seu crescimento fomentado entre 1 e 7 dias.

Durante o contato, os compostos sofrem o processo de oxidação e cedem elétrons para o citocromo C das bactérias devido à presença da enzima oxidase. Caso as bactérias se mostrem positivas quanto à atividade oxidante, surgirá uma tonalidade violeta na fita reativa. Se as fitas não demonstrarem alteração em sua cor, é possível concluir que essas bactérias são negativas quanto à oxidase. Este teste é um considerado um ensaio qualitativo.

4.4.3 Teste de urease

Este teste foi realizado através do crescimento de microrganismos em um meio específico, constituído por: 20 g/L de ureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$); 9,1 g/L de fosfato monopotássico; 9,5 g/L de fosfato dissódico; 0,1 g/L de extrato de levedura; 0,01 g/L^{-1} de vermelho fenol e 15 g/L de ágar bacteriológico. Foram vertidos 5mL do meio em tubos de 15 mL graduados e de vidro, previamente esterilizados, e em seguida foram deixados para resfriamento em uma angulação entre 30 e 45°.

A inoculação das bactérias no meio foi realizada com o auxílio de alças bacteriológicas descartáveis. Os tubos foram então incubados durante 7 dias a 28 °C. Durante a incubação, os microrganismos possuidores de urease degradaram a ureia, produzindo amônia e anidrido carbônico, aumentando assim o pH do meio. À medida que o pH se eleva, o vermelho de fenol presente no meio muda de uma coloração amarelada para um tom avermelhado ou rosa escuro. Logo, através de uma análise visual da coloração do meio, foi possível determinar se há a presença ou não da produção de urease nos microrganismos (ANVISA, 2004).

4.4.4 Teste de Catalase

A presença da enzima catalase em microrganismos é um parâmetro importante na identificação dos mesmos. Sua função consiste em transformar o peróxido de hidrogênio produzido ao longo da respiração das bactérias em água e oxigênio na forma gasosa. Sem a presença da catalase, o peróxido de hidrogênio não será degradado e pode destruir a célula devido à sua toxicidade (ANVISA, 2004).

O teste da catalase consiste na aplicação do peróxido de hidrogênio em uma cultura bacteriana. A análise realizada se baseia na formação ou não de bolhas durante o ensaio, provenientes da formação de oxigênio gasoso durante a quebra do peróxido de hidrogênio por parte das enzimas. Havendo a formação das bolhas, a bactéria é considerada positiva para a presença da catalase. Em caso contrário, a bactéria é tida como negativa.

Para a realização do ensaio foi utilizado peróxido de hidrogênio a 3%. Através do uso de alças bacteriológicas descartáveis foram retirados aproximadamente 0,02 mL de uma cultura bacteriana com crescimento entre 1 e 7 dias e depositados em uma lâmina microscópica de vidro 26x76 mm de ponta fosca desengordurada e limpa. O peróxido de hidrogênio foi aplicado com um auxílio de uma pipeta *pasteur* descartável na quantidade de uma gota por amostra sobre lâminas para microscopia.

4.4.5 Teste de hidrólise de amido

A enzima amilase é responsável por hidrolisar o amido (um polissacarídeo), degradando-o em maltose (um dissacarídeo) e alguns monossacarídeos, tais como a glicose. Tal processo permite que esses novos compostos atravessem a membrana celular por se tornarem substâncias molecularmente mais simples, sendo assim capazes de serem metabolizados pelas enzimas presentes no citoplasma da célula bacteriana.

A capacidade de degradação de amido é utilizada como critério para a presença de amilase. Para isso, é realizado um teste capaz de identificar a produção dessas enzimas pelos microrganismos. O teste consiste na percepção da alteração da cor do meio de acordo com a presença ou não das enzimas. O amido, na presença do iodo, produz uma coloração azul escura no meio. No caso da presença de amilase, nessa coloração surge um halo amarelado ao redor da colônia, indicando a degradação do amido por parte das enzimas, assim sendo um resultado positivo ao teste. Logo, fica evidente a atividade amilolítica.

As amostras foram inoculadas em meio *Nutrient Agar* (Acumedia), sendo posteriormente adicionado 2% de amido solúvel (Synth, Labsynth Produtos para Laboratório LTDA, São Paulo, Brasil) e incubadas a 28°C de 5 a 7 dias. Após esse período, com o crescimento das colônias bacterianas, foram adicionados às amostras 5 mL de solução de Lugol por 20 minutos.

4.4.6 Ensaio hemolítico

O biossurfactante pode provocar lise nas hemácias do sangue. Assim, o ensaio hemolítico foi utilizado como um método secundário para analisar as amostras bacterianas que tem esse potencial.

Para o teste de hemólise, foram inoculadas amostras bacterianas em placas Petri contendo o meio *Blood Agar Base* (Thermo Fisher Scientific) composto com (g/L): 10 extrato de carne, 10 peptona, 5 NaCl, 15 ágar, autoclavar o meio, e em seguida adicionar 5% de sangue humano. Incubar as placas a 37° C por 24 horas adaptado. (CARRILLO *et al.*, 1996; MEENA *et al.*, 2013). Segundo JOY *et al.* (2017), a análise das placas é realizada com os seguintes critérios: a existência de uma zona verde escura ao redor da colônia indica α -hemólise, caracterizada pela lise parcial das hemácias; presença da zona transparente ao redor da colônia demonstra β -hemólise, em que se verifica a lise total dos eritrócitos; não havendo evidências que comprovem a lise dos eritrócitos, indica γ - hemólise. Para constatação dos biossurfactantes são consideradas as análises que evidenciem Alfa e Beta hemólises.

4.5 Teste de fermentação das linhagens selecionadas

As culturas foram inoculadas em meio líquido descrito por DIAB e EL DIN (2013), com a seguinte composição (g/L): 1 NaNO₃, 0,5 NaCl, 2 HPO₄, 1 H₂PO₄, 0,5 MgSO₄.7H₂O, 0,01 FeCl₃, 0,5 extrato de levedura, 20 glicose. Para o processo de fermentação, realizou-se um pré-inoculo em *Erlenmeyer* com 100 mL do meio de cultura com uma alçada de microrganismos, mantidas por 12h em *shaker* (Tecnal, modelo TE - 421) a 30 ± 1°C, ao abrigo da luz, sob agitação orbital constante (180 rpm). Em seguida, foram retirados 10 mL do meio e transferido para um novo *Erlenmeyer* com o mesmo caldo nutritivo. As culturas foram incubadas por 72 h sob as mesmas condições citadas para o processo de fermentação. Foram então centrifugados (20 min, 5.000 G, 20°C) 50 mL das culturas de cada *Erlenmeyer* para obter o sobrenadante livre de células.

4.6 Produção dos biossurfactantes/bioemulsificantes

A produção de biossurfactantes pode ser identificada por meio de testes que avaliem a sua capacidade emulsificante. Primeiramente, foram realizados *screenings* primários como colapso de gota e dispersão de óleo mineral, que indicaram mais precisamente o potencial surfactante. Posteriormente, realizou-se *screenings* secundários nas amostras com potencial, tais como índice de emulsificação, atividade emulsificante e tensão superficial.

4.6.1 Avaliação da capacidade surfactante

O método do colapso de gota realizado por KUIPER *et al.* (2004), descreve a capacidade surfactante dos sobrenadantes livres de células. Depositou-se 50 μL de cada sobrenadante (amostras) sobre superfície hidrofóbica (*Parafilm*[®] M), e observou-se como a gota se comportava durante segundos ou minutos. A amostra apresenta capacidade surfactante quando a gota estiver dispersa na superfície hidrofóbica. Posteriormente, acrescentaram-se duas gotas de uma solução de azul de metileno (NEON Comercial Ltda) às amostras, com a finalidade de facilitar a visualização, não ocorrendo quaisquer influências. O controle negativo, utilizado foi o meio de cultura não inoculado.

A capacidade surfactante, foi determinada conforme a metodologia descrita por YOUSSEF *et al.* (2004). Foi adicionado em uma placa de Petri (90 mm de diâmetro) 50 mL de água ultrapura e adicionou-se 20 μL de óleo mineral estéril no centro da placa. Em seguida, foi acrescentada sobre o óleo (micela oleosa) uma alíquota de 10 μL de cada sobrenadante, sendo então o deslocamento do óleo o indicativo da capacidade surfactante.

4.6.2 Tensão superficial

A determinação da tensão superficial do líquido metabólico livre de células (sobrenadante) foi realizada utilizando um tensiômetro (modelo Sigma 70-KSV) automático aplicando a técnica do anel (1,9 cm de diâmetro) de Du Nouy (KUYUKINA *et al.*, 2001; DECESARO *et al.*, 2013). A tensão foi medida para 88 linhagens diferentes, incluindo aquelas que apresentaram resultados positivos e negativos em relação aos outros métodos descritos anteriormente para avaliação dos biossurfactantes. A água pura foi utilizada como padrão. O valor da tensão superficial mostrada é a média de três leituras da mesma cultura.

4.6.3 Índice de emulsificação E_{24}

A capacidade emulsificante das amostras foi determinada a partir do índice de emulsificação, analisadas segundo a metodologia descrita por COOPER e GOLDENBERG, (1987). Foram depositados 3 mL em tubos que continham hidrocarbonetos (tais como xileno, tolueno, querosene e benzeno) para alíquotas de 2 mL do sobrenadante. Posteriormente foi realizada a homogeneização em vórtex (2 min, temperatura ambiente) e mantido em incubação por 24h a temperatura ambiente. Em seguida, foi determinada a altura (cm) da zona de emulsão formada em relação ao volume total da mistura. O índice de emulsificação é calculado através da equação (1)

$$E_{24} \% = \frac{H_e \times 100}{H_t} \quad (1)$$

Onde:

E_{24} = Índice de emulsificação após 24h

H_e = Altura da emulsão (cm)

H_t = Altura total do líquido (cm)

4.6.4 Determinação da atividade emulsificante

A atividade emulsificante foi determinada após os cálculos descritos no item 4.7.3. A fase aquosa foi removida com o auxílio de uma pipeta *pasteur* de vidro, transferida para uma cubeta de quartzo e sua absorvância determinada. A leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro (Hach, modelo DR 5000 UV-VIS) à 400 nm, considerando a unidade de atividade de emulsão por EU/ml (PATIL e CHOPADE, 2001). A Eq. (2) apresenta o cálculo da atividade emulsificante

$$\frac{EU}{mL} = \frac{\text{Absorvância de } 400\text{nm} \times \text{fator de diluição}}{0,01} \quad (2)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Isolamento das colônias bacterianas

Foram isoladas 88 linhagens, sendo 20 provenientes das amostras coletadas no Povoado das Cabras e 68 referentes ao manguezal da praia Formosa. É importante notar uma maior diversidade de bactérias dentre os isolados do ambiente que sofre atividade antrópica, através do despejo de efluentes de esgoto doméstico já a partir do ponto 1, localizado na cidade de Aracaju, quando em comparação com as amostras do município da Barra dos Coqueiros, que não apresenta descarte de efluentes domésticos em seus arredores. A Figura 14 apresenta uma pequena amostra de espécies de actinomicetos com diferentes fenótipos nos dois ambientes analisados.

O meio de cultura utilizado para o isolamento favorece a obtenção de possíveis bactérias da ordem *Actinomycetales*, isto é, um meio seletivo para a obtenção da mesma. Em sua composição, contém como fonte de nitrogênio o caseinato de sódio e a asparagina (aminoácido) (HiMedia). A partir deste meio de cultivo (HiMedia), as linhagens obtidas foram então inoculadas em meio específico para produção de biossurfactante de acordo com a metodologia proposta por Diab e El Din (2013), a partir deste realizado o *screening* de actinomicetos. De acordo com WOHL e MCARTHUR (1998), o meio utilizado se mostra vantajoso nos casos em que não houve a utilização de antibióticos para impedir a proliferação de outros grupos microbianos da ordem *Actinomycetales*.

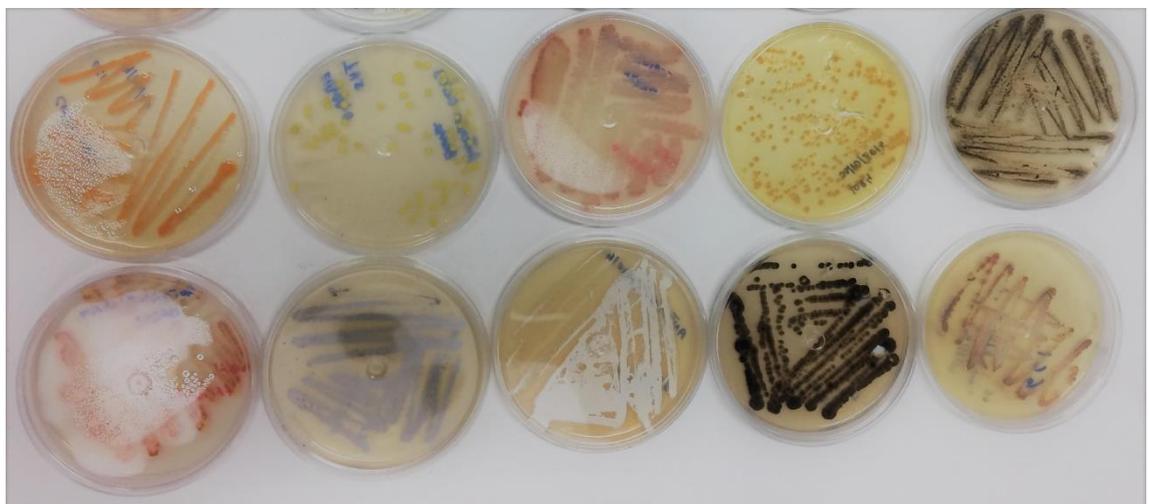


Figura 14: Aspecto visual de alguns isolados obtidos das actinobactérias.

5.2 Características bioquímicas dos microrganismos isolados

Com a finalidade de identificar grupos ou espécies de bactérias pertencentes à ordem *Actinomycetales* foi realizado um conjunto de provas necessárias para a identificação bioquímica das colônias suspeitas através da verificação das transformações químicas, que ocorrem num determinado substrato, pela ação das enzimas de um dado microrganismo. Os resultados das características bioquímicas dos isolados obtidos nos mangues são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8: Características dos isolados bacterianos estudados. Bactérias com o sufixo BA foram isoladas do manguezal da Barra dos Coqueiros-SE, enquanto aquelas com a codificação 13 são oriundas do manguezal da Praia Formosa-SE.

<i>Amostra</i>	<i>Gram</i>	<i>Catalase</i>	<i>Oxidase</i>	<i>Urease</i>	<i>Hemólise</i>	<i>Amilase</i>
1A1-BA	-	-	-	+	γ	+
2B2-BA	+	+	-	+	β	-
2C1-BA	+	+	-	+	γ	+
3A1-BA	+	+	-	-	β	-
3A3A-BA	+	+	+	+	β	-
3B1-BA	+	+	-	-	β	-
3B2-BA	+	+	+	-	β	-
6A4-BA	+	+	-	-	γ	+
6B1-BA	+	+	-	+	γ	+
6B1.2-BA	+	+	-	-	γ	+
6C-BA	+	-	-	-	β	-
6C2-BA	+	+	+	+	β	-
7A1-BA	+	+	-	-	β	-
7B4-BA	+	+	-	-	γ	-
9A2-BA	+	-	-	-	β	-
10C3-BA	+	+	-	+	γ	+
10F1-BA	-	-	-	+	γ	+
10F2-BA	+	-	-	-	β	-
10F4-BA	+	+	-	-	β	-
10F6-BA	+	-	+	-	β	+
1B2-13	+	+	-	-	β	-
1.2A1-13	+	+	+	+	γ	+
1.2A4-13	+	+	-	-	α	-
1.2A5-13	-	+	+	-	α	-
1.2B1-13	+	-	+	-	γ	+
1.2B3-13	+	+	-	-	γ	+
2C5-13	-	+	+	-	α	+
3A2-13	+	+	-	+	γ	+
3A3-13	+	+	-	-	β	-
3B2-13	+	+	-	-	γ	+
3C2-13	+	+	+	+	γ	+
4A2-13	+	+	+	-	γ	+
4A3-13	+	+	+	-	γ	-
4B2-13	-	+	+	-	γ	+
4B3-13	+	+	+	-	α	-
4B6-13	-	+	+	-	β	+
5A1-13	+	+	-	+	β	-

Continuação Tabela 8.

<i>Amostra</i>	<i>Gram</i>	<i>Catalase</i>	<i>Oxidase</i>	<i>Urease</i>	<i>Hemólise</i>	<i>Amilase</i>
5A2-13	+	+	+	+	γ	-
5A3-13	+	+	-	+	γ	-
5A4-13	+	+	-	-	γ	+
5A5-13	+	+	-	-	γ	-
5B1-13	+	+	+	-	γ	+
5C1-13	+	+	+	+	α	-
5C4-13	+	+	+	+	α	-
5C7-13	+	+	-	-	β	+
5C8-13	-	+	-	-	γ	+
6A2-13	+	+	+	-	β	-
6A3-13	+	+	+	-	α	+
6B1-13	+	+	-	-	α	-
6B1.2-13	-	+	+	-	α	-
6B2-13	+	-	+	+	γ	+
6C1-13	+	+	-	+	γ	+
6C2-13	-	+	-	+	β	-
6C3-13	+	+	+	+	β	+
7A1-13	+	+	+	+	β	-
7A2-13	+	+	+	+	β	-
7A4-13	+	-	-	+	β	-
7A5-13	+	+	-	+	β	+
7A6-13	+	+	+	-	β	+
7A7-13	+	+	+	+	β	-
7B3-13	+	+	+	+	γ	-
7B4-13	+	+	+	+	β	-
7B5-13	+	+	-	+	γ	-
7C1-13	+	+	+	-	γ	+
7C2-13	+	+	+	-	β	-
7C3-13	+	+	-	+	γ	-
8A3-13	-	+	+	-	β	-
8A9-13	-	+	+	+	α	+
8B1-13	+	+	+	+	γ	-
8B2-13	+	+	+	+	γ	-
8B3-13	+	+	+	-	α	+
8B4-13	+	+	+	-	γ	+
8B5-13	+	-	+	+	γ	+
8C1-13	+	+	-	+	β	-
8C2-13	+	+	+	-	γ	-
8C5-13	-	-	-	-	β	+
8C6-13	+	+	-	-	β	-
8C7-13	+	+	+	-	β	+
9A2-13	+	-	-	+	β	-
9A4-13	+	+	+	+	β	+
9A6-13	+	-	-	-	γ	-
10A11A1-13	+	+	+	-	α	-
10A11A6-13	+	+	+	-	β	-
10B1-13	+	+	-	-	γ	+
10B2-13	+	+	-	+	γ	-
11A2-13	+	+	-	+	β	-
11B2-13	+	+	-	-	γ	-
1A1/2.1-13	+	+	-	-	γ	+

Legenda: (+) = positivo; (-) = negativo; (α) = α-hemolítico; (β) = β-hemólise; (γ) = γ- hemólise.

No cultivo em ágar sangue, dentre os 88 microrganismos estudados, 37 apresentaram características de β -hemólise enquanto 13 se mostraram α -hemólise após o período de incubação por 24 h, a temperatura de 37 °C (Figura 15). O ágar sangue é um meio rico em nutrientes que propicia o crescimento de diversos microrganismos (WALTER *et al.*, 2013). Segundo JOY *et al.* (2017) as amostras que apresentam resultados positivos para α e β -hemólise têm potencial para produção biossurfactante, enquanto que os microrganismos que resultaram negativamente são classificados como γ -hemolíticos. Esse princípio é afirmado por CARRILLO *et al.* (1996) ao avaliar a atividade hemolítica como um bom critério de *screening* na busca por linhagens produtoras de surfactina. Por outro lado, Youssef *et al.* (2004) contrapõe que em alguns casos acontece a lise do ágar sangue devido a outros produtos microbiais virulentos (microrganismos que se multiplicam dentro de um outro organismo), levando a resultados falso positivos e negativos. Assim, não se pode afirmar que amostras positivas para o teste de atividade hemolítica necessariamente serão produtoras de biossurfactantes.

É possível concluir que o teste de atividade hemolítica pode ser utilizado como *screening* preliminar, mas deve ser suportado por outras técnicas baseadas no índice de atividade emulsificante ou de tensão superficial, como teste do colapso de gota ou dispersão de óleo, assim evitando resultados falso positivos (MULLIGAN *et al.*, 1984).

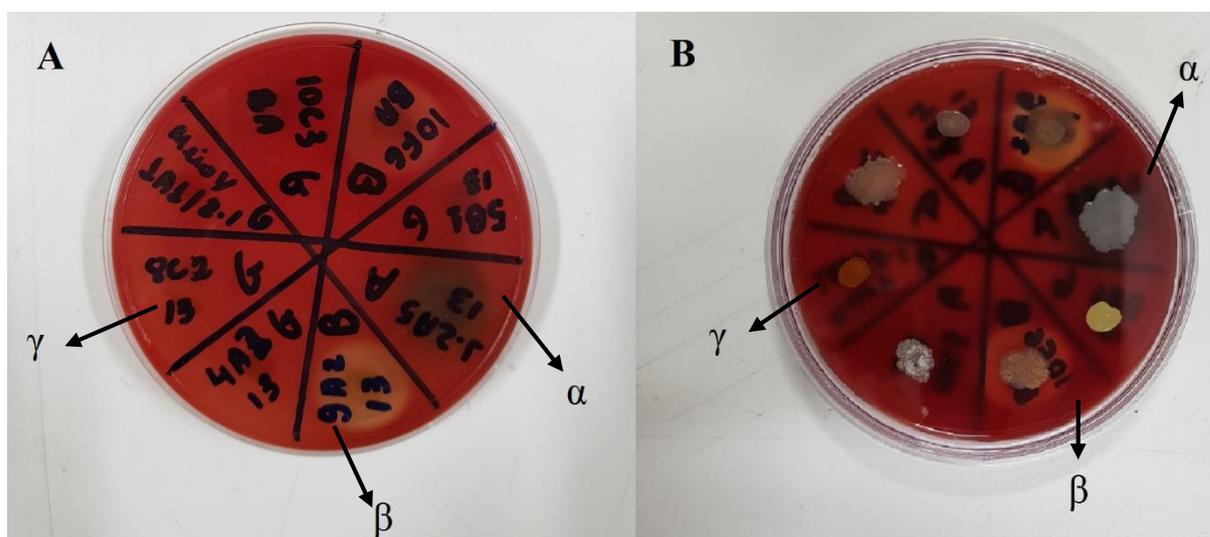


Figura 15: Aspecto visual com os resultados para detecção de bactérias produtoras de α -hemólise, β -hemólise e γ -hemólise. a) frente da placa ágar sangue e bactéria inoculada; b) verso da placa do ágar sangue.

Observou-se também 38 isolados foram capazes de hidrolisar o amido, quando este substrato estava presente no meio de cultura especificado. Esse resultado mostra a presença da enzima amilase. Segundo BARROS *et al.* (2013) a capacidade de produção da amilase pode ser

relacionada com o potencial de produção de biossurfactante, devido ao grande número de espécies que se mostram positivas em ambas as características, como por exemplo as do gênero *Bacillus* e as actinobactérias. A Figura 16 apresenta o halo formado pela bactéria comprovando a hidrólise do amido.



Figura 16: Aspecto do resultado positivo para detecção de bactérias produtoras de α -amilases (Amostra 4B2-13).

5.3 Produção de moléculas biossurfactantes

A partir do meio de cultivo (AIA) as linhagens obtidas foram então inoculadas em meio específico para produção de biossurfactante descrito no item 4.5, e a partir daí realizada a fermentação para os *screenings* primários (colapso da gota, dispersão do óleo) e secundários (tensão superficial e capacidade emulsificante) (JOY *et al.*, 2017).

O teste do colapso da gota é executado como método qualitativo para detecção da produção de biossurfactantes, apresentando como vantagem resultados imediatos e a possibilidade de acompanhar visualmente a sua ação (YOUSSEF *et al.*, 2004; KORAYEM *et al.*, 2015)

Os resultados positivos para o teste foram identificados pelo colapso da gota (figura 17) na superfície hidrofóbica do *Parafilm*[®] M. Para comprovação desse teste é de extrema importância utilizar somente o sobrenadante livre de células, eliminando assim a possibilidade do falso-positivo. Tal fato seria possível devido a algumas cepas serem naturalmente

hidrofóbicas, ocorrendo assim o colapso da gota sem que a molécula surfactante seja produzida (ARIECH e GUECHI, 2015).

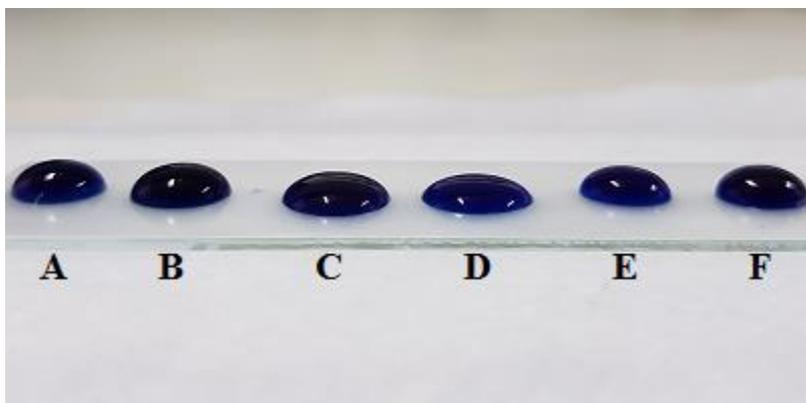


Figura 17: Teste do colapso de gota; a) controle; b) amostra 6C2-BA; c) amostra 4B6-13; d) amostra 10F2-BA; e) amostra 1.2A5-13; f) amostra 5C4-13

Segundo WALTER *et al.* (2013) a estabilidade da gota depende da concentração surfactante e é correlacionada com a tensão superficial e interfacial. O método apresenta uma baixa sensibilidade devido à necessidade de uma concentração significativa de compostos superficiais ativos para causar o colapso da gota. Os autores afirmam que, embora esse teste seja considerado qualitativo, o mesmo pode ser considerado quantitativo se forem medidas as dimensões da gota com um micrômetro.

Enquanto CHAKRABORTY *et al.* (2015) afirmam que o processo de triagem não é adequado para identificar todos os tipos de moléculas produtoras de biossurfactantes, o teste de colapso da gota pode resultar um falso negativo, dado que algumas amostras possuem pouca quantidade de surfactante. Assim, torna-se necessária a realização dos testes de deslocamento de óleo, tensão superficial e atividade emulsificante para comprovar a capacidade surfactante.

As cepas encontradas apresentaram resultados semelhantes para 10 isolados nos ensaios com colapso de gotas e de dispersão do óleo (Tabela 9). De acordo com PLAZA *et al.* (2006) e CAMACHO-CHAB *et al.* (2013) a técnica de dispersão de óleo é mais sensível do que o método da gota para a detecção de biossurfactantes. O substrato hidrofóbico torna-se mais acessível aos microrganismos quando disperso, assim facilitando a sua degradação (ARIECH e GUECHI, 2015). Segundo ALVAREZ, a estabilidade da gota e a dispersão do óleo são confiáveis, pois dependem da tensão superficial e podem ser correlacionadas com a concentração de biossurfactantes.

Do total, 78 amostras não colapsaram quando colocadas sobre a superfície hidrofóbica, mostrando assim resultados negativos para produção de biossurfactantes. Apenas 10 linhagens (1.2A5, 4B2, 4B6, 5A.2, 5A.3, 5A4, 10A11A6, 11B2, 6C.2, 10F2-BA) apresentaram resultados positivos tanto para o colapso da gota quanto para a dispersão do óleo. Estas linhagens demonstraram, respectivamente, uma redução da tensão superficial para $37,56 \pm 1,15$; $31,53 \pm 0,53$; $31,61 \pm 0,39$; $36,00 \pm 0,97$; $32,11 \pm 0,79$; $31,87 \pm 0,66$; $36,34 \pm 0,87$; $35,52 \pm 0,36$; $38,89 \pm 0,75$ e $31,07 \pm 0,09$ mN/m em relação ao controle ($72,49 \pm 0,03$ mN/m). A média dessas amostras resultam em um valor de 34,25 mN/m, que representa uma redução de 47,25% em relação ao controle. As demais linhagens apresentaram resultados inseridos no intervalo de 35 a 69 mN/m. Embora algumas amostras tenham apresentado resultados abaixo dos 40 mN/m de tensão superficial, seus resultados para os testes de colapso da gota e dispersão do óleo foram negativos.

Tabela 9: Resultados da tensão superficial, teste do colapso da gota e dispersão do óleo utilizando os sobrenadantes livres de células das amostras

Isolados	Local	Colapso da gota	Dispersão do óleo	Tensão superficial (mN/m)
1B.2	13	-	-	$42,66 \pm 0,14$
1.2A.1	13	-	-	$47,56 \pm 0,02$
1.2A.4	13	-	-	$57,78 \pm 0,28$
1.2A.5	13	+	+	$37,56 \pm 1,15$
1.2B.1	13	-	+	$39,92 \pm 0,20$
1.2B.3	13	-	-	$61,46 \pm 0,36$
2C.5	13	-	-	$41,47 \pm 1,18$
3A.2	13	-	-	$45,70 \pm 0,16$
3A.3	13	-	-	$47,54 \pm 0,22$
3B.2	13	-	-	$50,58 \pm 0,47$
3C.2	13	-	-	$53,78 \pm 0,51$
4A.2	13	-	-	$48,11 \pm 0,14$
4A.3	13	-	-	$54,23 \pm 0,24$
4B.2	13	+	+	$31,53 \pm 0,53$
4B.3	13	-	-	$46,51 \pm 0,05$
4B.6	13	+	+	$31,61 \pm 0,39$
5A.1	13	-	+	$41,04 \pm 0,05$
5A.2	13	+	+	$36,00 \pm 0,97$
5A.3	13	+	+	$32,11 \pm 0,79$
5A.4	13	+	+	$31,87 \pm 0,66$
5A.5	13	-	+	$45,82 \pm 0,30$
5B.1	13	-	-	$45,29 \pm 0,21$
5C.1	13	-	-	$40,65 \pm 0,45$
5C.4	13	-	-	$45,63 \pm 0,31$
5C.7	13	-	-	$45,56 \pm 0,09$
5C.8	13	-	-	$38,99 \pm 0,55$

Continuação Tabela 9.

Isolados	Local	Colapso da gota	Dispersão do óleo	Tensão superficial (mN/m)
6A.2	13	-	-	51,03 ± 0,25
6A.3	13	-	-	47,44 ± 0,15
6B.1	13	-	-	43,23 ± 0,19
6B.1.2	13	-	+	37,83 ± 0,60
6B.2	13	-	-	63,98 ± 0,48
6C.1	13	-	-	44,82 ± 0,25
6C.2	13	-	+	42,87 ± 0,67
6C.3	13	-	-	64,28 ± 0,78
7A.1	13	-	-	43,23 ± 0,15
7A.2	13	-	-	43,78 ± 1,25
7A.4	13	-	-	44,94 ± 0,07
7A.5	13	-	-	49,02 ± 0,62
7A.6	13	-	-	48,68 ± 0,50
7A.7	13	-	-	43,28 ± 0,62
7B.3	13	-	-	42,28 ± 0,15
7B.4	13	-	-	66,98 ± 0,31
7B.5	13	-	-	44,46 ± 0,26
7C.1	13	-	-	48,69 ± 0,11
7C.2	13	-	-	41,58 ± 1,18
7C.3	13	-	-	45,45 ± 0,08
8A.3	13	-	-	41,55 ± 0,44
8A.9	13	-	-	51,29 ± 0,44
8B.1	13	-	-	47,51 ± 0,31
8B.2	13	-	-	47,72 ± 0,42
8B.3	13	-	-	51,89 ± 0,50
8B.4	13	-	-	44,53 ± 0,09
8B.5	13	-	-	51,42 ± 0,26
8C.1	13	-	-	47,69 ± 0,48
8C.2	13	-	-	50,66 ± 0,41
8C.5	13	-	-	69,46 ± 0,59
8C.6	13	-	-	41,23 ± 0,12
8C.7	13	-	-	39,58 ± 0,12
9A.2	13	-	-	41,32 ± 0,01
9A.4	13	-	-	40,16 ± 0,05
9A.6	13	-	-	47,24 ± 0,69
10A11A1	13	-	-	54,65 ± 1,22
10A11A6	13	+	+	36,34 ± 0,87
10B.1	13	-	-	47,22 ± 0,53
10B.2	13	-	-	54,27 ± 0,38
11A.2	13	-	-	49,05 ± 0,58
11B.2	13	+	+	35,52 ± 0,36
1A.1	BA	-	-	60,77 ± 0,67
2B.2	BA	-	-	49,36 ± 0,28
2C.1	BA	-	-	52,43 ± 0,14
3A.1	BA	-	-	65,36 ± 0,26

Continuação Tabela 9.

Isolados	Local	Colapso da gota	Dispersão do óleo	Tensão superficial (mN/m)
3A3A	BA	-	-	48,79 ± 0,69
3B.1	BA	-	-	68,89 ± 0,57
3B.2	BA	-	-	43,32 ± 2,09
6A.4	BA	-	-	42,97 ± 0,11
6B.1	BA	-	-	50,79 ± 0,41
6B.1.2	BA	-	-	41,31 ± 0,13
6C	BA	-	-	35,55 ± 0,86
6C.2	BA	+	+	38,89 ± 0,76
7A.1	BA	-	-	63,99 ± 0,68
7B.4	BA	-	-	61,02 ± 0,25
9A.2	BA	-	-	46,06 ± 0,13
10C.3	BA	-	-	56,79 ± 0,14
10F.1	BA	-	-	60,53 ± 0,69
10F.2	BA	+	+	31,07 ± 0,09
10F.4	BA	-	-	42,61 ± 0,32
10F.6	BA	-	-	45,82 ± 0,38
1A 1/2.1	13	-	-	50,92 ± 0,78

Legenda: (+) representa resultados positivos para os testes. (-) representa resultados negativos.

A partir da leitura da tensão superficial pode-se observar que ocorreu a redução da mesma quando ocorreu o colapso da gota. Segundo JOY *et al.* (2017) um biossurfactante é considerado eficiente quando possui a habilidade de reduzir a tensão superficial para valores abaixo de 40 mN/m. De acordo com MADHU e PRAPULLA (2014) e GAGELIDZE *et al.* (2016) o gênero *Bacillus sp.* representa bons produtores de surfactina, chegando a reduzir a tensão superficial até valores em torno dos 27 mN/m. Os considerados mais efetivos conseguem reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para faixas entre 25 e 30 mN/m, tornando-os indicados para a recuperação melhorada do petróleo (MEOR) (PEELE *et al.*, 2016).

As medições da tensão devem ser realizadas cuidadosamente, pois mesmo que o aumento da concentração de surfactantes reduza a tensão durante o ensaio, após um certo valor limite não é possível detectar essa redução. Esse limite é conhecido como concentração crítica micelar (CMC) (WALTER *et al.*, 2010). Segundo CAI *et al.* (2014) resultados mostram que a redução da tensão superficial e a capacidade emulsificante não estão necessariamente correlacionadas. Biossurfactantes tanto podem formar micelas na interface entre líquidos imiscíveis (reduzindo assim as tensões superficiais e interfaciais), como podem formar emulsões estáveis (bioemulsificantes).

5.3.1 Capacidade emulsificante

O potencial molecular das amostras verifica o índice de emulsificação dos hidrocarbonetos testados (querosene, benzeno, tolueno e xileno). Os 88 isolados testados (Tabela 10) apresentaram melhores propriedades emulsificantes utilizando tolueno quando comparados ao uso do benzeno, querosene e xileno. Entretanto, todos os hidrocarbonetos utilizados apresentaram pelo menos um valor de E_{24} acima dos 50%. Para o xileno, tolueno, benzeno e querosene, os resultados e isolados correspondentes foram, respectivamente, iguais a 50% (1.2B3), 62,5% (7A.5), 62,07% (6C.3) e 52,27% (10F.2-BA).

Resultados semelhantes foram obtidos por PEELE *et al.* (2016). Os autores verificaram valores de E_{24} do sobrenadante livre de células com os hidrocarbonetos tolueno, xileno, diesel, querosene, benzeno e óleo de motor, sendo o maior valor obtido na presença do tolueno.

Ao analisar os isolados, é perceptível o tamanho do intervalo que compreende os limites inferior e superior dos índices calculados. As amostras diferem entre si na capacidade de emulsionar os solventes, onde 84% das amostras do tolueno, xileno e benzeno apresentaram um índice inferior a 10%, enquanto que para o querosene esse valor sobe para 87,5%. Dentre as amostras testadas, o maior índice é representado pela linhagem 5C.1, que possui o maior potencial para o E_{24} (%) calculado para todos os substratos. Por outro lado, embora essa linhagem tenha apresentado os melhores índices emulsificantes, o seu resultado no teste de redução da tensão superficial foi igual a 40,65 mN/m. Como mencionado anteriormente, os resultados que apresentam maior eficiência se encontram abaixo dos 40 mN/m. Isso evidencia a afirmação de CAI *et al.* (2014) acerca da não obrigatoriedade da relação entre a tensão superficial e o índice emulsificante.

A produção de biossurfactantes e a tensão superficial são dependentes do crescimento da cultura no meio fermentativo. O aumento da tensão superficial e o decréscimo do índice emulsificante mostram que a biossíntese de surfactantes é interrompida. Isso acontece devido à produção de metabólitos secundários, que vão interferir na formação de emulsões e na absorvância de moléculas surfactantes na interface óleo-água (KHOPADE *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos por SATPUTE *et al.* (2008) demonstram que apenas 6% dos isolados costumam apresentar valores de índice emulsificante superiores a 60%. Tais valores se mostram condizentes, visto que no presente trabalho o percentual de amostras acima dos

60% de E₂₄ resultou em apenas 2,3%. Alguns valores de desvio padrão referentes à atividade emulsificante foram menores que 0,0005, sendo então representados como 0,000.

Tabela 10: Valores calculados de E₂₄ e atividade emulsificante em função do meio.

Isolados	E ₂₄ (%) índice emulsificante				Atividade Emulsificante			
	Xileno	Tolueno	Benzeno	Querosene	Xileno	Tolueno	Benzeno	Querosene
1B.2	6,82	6,82	4,55	4,55	0,57 ± 0,0005	4,33 ± 0,0005	3,97 ± 0,0005	3,00 ± 0,000
1.2A.1	2,94	0,00	0,00	5,26	1,17 ± 0,0005	2,53 ± 0,0005	1,37 ± 0,0005	0,87 ± 0,0005
1.2A.4	0,00	0,00	0,00	0,00	8,20 ± 0,0049	5,70 ± 0,0022	8,57 ± 0,0017	0,40 ± 0,0008
1.2A.5	3,64	2,17	4,35	0,00	3,50 ± 0,0036	1,97 ± 0,0009	4,30 ± 0,0008	0,93 ± 0,0005
1.2B.1	6,82	9,09	11,36	4,55	1,93 ± 0,0017	1,70 ± 0,000	3,90 ± 0,000	0,57 ± 0,0017
1.2B.3	50,00	31,58	35,48	2,86	7,23 ± 0,0165	3,17 ± 0,0107	17,97 ± 0,0430	0,030 ± 0,000
2C.5	2,27	2,27	0,00	2,27	9,87 ± 0,0047	1,37 ± 0,0005	3,33 ± 0,0025	0,70 ± 0,000
3A.2	3,13	12,50	22,86	14,29	4,23 ± 0,0017	20,93 ± 0,0042	4,27 ± 0,0005	1,97 ± 0,0005
3A.3	0,00	0,00	0,00	0,00	3,93 ± 0,0005	13,27 ± 0,0053	19,30 ± 0,0214	0,27 ± 0,0005
3B.2	15,15	18,18	42,86	9,68	1,47 ± 0,0045	0,80 ± 0,0008	2,97 ± 0,0024	3,67 ± 0,0026
3C.2	6,25	2,70	18,75	6,06	0,67 ± 0,0012	1,80 ± 0,000	2,53 ± 0,0021	1,97 ± 0,0019
4A.2	0,00	0,00	0,00	0,00	2,10 ± 0,000	4,37 ± 0,0037	0,17 ± 0,0005	0,67 ± 0,0019
4A.3	5,88	0,00	0,00	0,00	6,40 ± 0,0088	13,47 ± 0,0137	3,10 ± 0,0022	0,30 ± 0,000
4B.2	2,27	2,27	2,17	0,00	1,13 ± 0,0015	6,53 ± 0,0005	4,67 ± 0,0005	0,90 ± 0,000
4B.3	0,00	0,00	0,00	0,00	1,57 ± 0,016	5,80 ± 0,000	0,00 ± 0,000	1,27 ± 0,0019
4B.6	6,82	6,82	6,82	2,27	0,28 ± 0,0013	3,80 ± 0,0014	4,13 ± 0,0009	0,33 ± 0,0009
5A.1	4,55	2,27	2,27	2,27	0,70 ± 0,0037	1,30 ± 0,000	4,40 ± 0,000	2,00 ± 0,000
5A.2	14,29	13,64	6,82	4,55	0,47 ± 0,0012	0,10 ± 0,000	4,30 ± 0,0008	0,77 ± 0,0005
5A.3	2,27	0,00	2,27	0,00	1,37 ± 0,0029	0,63 ± 0,0005	4,23 ± 0,0009	0,10 ± 0,000
5A.4	4,55	3,64	4,55	0,00	2,30 ± 0,0029	2,10 ± 0,0008	4,00 ± 0,0008	0,93 ± 0,0009
5A.5	2,70	2,78	0,00	0,00	21,20 ± 0,0014	23,47 ± 0,0070	7,00 ± 0,0116	0,27 ± 0,0005
5B.1	12,50	27,78	53,85	14,71	0,70 ± 0,000	4,80 ± 0,0014	232,2 ± 1,3407	3,23 ± 0,0005
5C.1	47,06	57,14	15,15	5,71	1,70 ± 0,0024	7,53 ± 0,0021	3,60 ± 0,0036	2,30 ± 0,0022
5C.4	6,06	2,78	2,78	3,13	2,13 ± 0,0113	8,57 ± 0,0127	2,77 ± 0,0009	0,17 ± 0,0005
5C.7	0,00	0,00	0,00	0,00	11,03 ± 0,0093	16,60 ± 0,0016	4,33 ± 0,0021	1,07 ± 0,0012

Continuação Tabela 10.

Isolados	Índice de Emulsificação E24 (%)				Atividade Emulsificante			
	Xileno	Tolueno	Benzeno	Querosene	Xileno	Tolueno	Benzeno	Querosene
5C.8	2,27	2,27	4,55	4,55	0,60 ± 0,0022	0,40 ± 0,000	3,03 ± 0,0012	2,07 ± 0,0024
6A.2	9,09	8,33	2,86	8,33	0,47 ± 0,0005	5,33 ± 0,0056	1,20 ± 0,0014	2,27 ± 0,0012
6A.3	0,00	0,00	0,00	0,00	1,77 ± 0,0047	2,00 ± 0,000	0,77 ± 0,0009	0,73 ± 0,0005
6B.1	0,00	5,41	2,63	0,00	2,77 ± 0,0037	4,67 ± 0,0074	3,57 ± 0,0060	1,37 ± 0,0005
6B.1.2	15,91	4,55	2,27	22,73	6,60 ± 0,0165	2,73 ± 0,0005	3,93 ± 0,0039	2,20 ± 0,000
6B.2	0,00	2,63	0,00	0,00	10,33 ± 0,0021	6,43 ± 0,0265	21,90 ± 0,0096	0,87 ± 0,0005
6C.1	19,44	41,67	11,11	0,00	5,13 ± 0,0111	12,33 ± 0,0012	1,67 ± 0,0045	1,63 ± 0,0009
6C.2	13,46	1,92	9,62	1,92	1,30 ± 0,0016	3,50 ± 0,000	10,10 ± 0,0008	0,60 ± 0,0014
6C.3	26,47	21,88	62,07	11,43	0,73 ± 0,0046	2,03 ± 0,0111	8,73 ± 0,0061	1,47 ± 0,0009
7A.1	6,45	3,13	3,33	0,00	1,00 ± 0,0014	3,83 ± 0,0005	2,47 ± 0,0025	0,83 ± 0,0005
7A.2	3,13	0,00	0,00	0,00	0,27 ± 0,0005	2,93 ± 0,0005	1,53 ± 0,0005	0,63 ± 0,0009
7A.4	0,00	0,00	0,00	0,00	2,03 ± 0,0012	14,47 ± 0,0154	3,93 ± 0,0187	1,70 ± 0,0008
7A.5	5,56	62,50	0,00	9,09	2,03 ± 0,0052	9,07 ± 0,0005	0,43 ± 0,0025	0,97 ± 0,0005
7A.6	2,63	2,63	2,70	0,00	12,37 ± 0,0041	5,67 ± 0,0005	3,70 ± 0,0024	1,23 ± 0,0009
7A.7	6,45	9,38	6,45	0,00	1,07 ± 0,0082	4,83 ± 0,0005	2,90 ± 0,000	1,27 ± 0,0009
7B.3	2,94	2,78	3,23	2,94	3,00 ± 0,0016	5,60 ± 0,0057	4,43 ± 0,0012	1,37 ± 0,0005
7B.5	2,70	31,25	12,50	0,00	2,70 ± 0,0042	10,10 ± 0,0073	4,50 ± 0,0029	1,27 ± 0,0005
7C.1	5,26	2,63	5,41	7,89	2,10 ± 0,000	26,67 ± 0,0025	32,50 ± 0,0139	2,63 ± 0,0005
7C.2	0,00	2,86	2,86	2,86	0,90 ± 0,0037	3,73 ± 0,0005	2,30 ± 0,0078	0,30 ± 0,000
7C.3	2,78	0,00	0,00	0,00	16,50 ± 0,0106	7,57 ± 0,0109	15,40 ± 0,0126	1,67 ± 0,0026
8A.3	2,86	2,94	0,00	2,78	1,20 ± 0,0016	1,67 ± 0,0009	4,27 ± 0,0005	2,83 ± 0,0021
8A.9	10,81	0,00	13,16	7,89	13,83 ± 0,0050	19,87 ± 0,0054	7,23 ± 0,0119	1,37 ± 0,0021
8B.1	0,00	0,00	0,00	0,00	3,03 ± 0,0181	1,13 ± 0,0033	3,17 ± 0,0134	4,37 ± 0,0005
8B.2	0,00	2,78	0,00	3,03	1,80 ± 0,0028	7,53 ± 0,0021	3,63 ± 0,0038	2,30 ± 0,0022
8B.3	0,00	6,67	0,00	0,00	6,50 ± 0,0067	2,97 ± 0,0017	5,80 ± 0,0289	1,53 ± 0,0005
8B.4	2,78	9,38	10,00	5,26	0,53 ± 0,0017	5,30 ± 0,000	1,47 ± 0,0110	2,33 ± 0,0009
8B.5	0,00	0,00	0,00	0,00	19,43 ± 0,0150	13,50 ± 0,0029	22,00 ± 0,0016	0,83 ± 0,0005
8C.1	2,70	0,00	0,00	2,63	1,80 ± 0,0036	1,97 ± 0,0026	7,40 ± 0,0163	2,17 ± 0,0005

Continuação Tabela 10.

Isolados	E24 (%) Índice de emulsificação				Atividade Emulsificante			
	Xileno	Tolueno	Benzeno	Querosene	Xileno	Tolueno	Benzeno	Querosene
8C.2	0,00	0,00	0,00	2,70	0,57 ± 0,0009	2,17 ± 0,0031	0,20 ± 0,000	0,70 ± 0,000
8C.5	23,53	17,14	0,00	27,27	1,10 ± 0,000	9,00 ± 0,0022	0,17 ± 0,0005	0,60 ± 0,000
8C.6	0,00	0,00	0,00	3,13	0,17 ± 0,0005	3,60 ± 0,0016	1,67 ± 0,0009	1,77 ± 0,0024
8C.7	9,09	10,87	8,70	31,82	0,10 ± 0,000	1,33 ± 0,0005	4,57 ± 0,0005	0,37 ± 0,0005
9A.2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10 ± 0,000	1,90 ± 0,000	4,43 ± 0,0009	0,40 ± 0,000
9A.4	0,00	3,23	0,00	0,00	2,10 ± 0,0205	0,23 ± 0,0005	1,70 ± 0,0009	2,53 ± 0,0005
9A.6	2,86	5,71	2,78	0,00	25,63 ± 0,0140	6,07 ± 0,0033	4,30 ± 0,0054	1,60 ± 0,000
10A11A1	5,41	2,70	8,33	15,79	19,57 ± 0,0061	17,93 ± 0,0187	3,53 ± 0,0005	1,03 ± 0,0009
10A11A6	2,27	4,55	2,27	0,00	1,67 ± 0,0048	1,10 ± 0,000	2,37 ± 0,0021	2,70 ± 0,000
10B.1	2,78	0,00	2,78	2,63	0,23 ± 0,0005	2,70 ± 0,0233	5,87 ± 0,0221	1,30 ± 0,0014
10B.2	0,00	0,00	0,00	0,00	2,63 ± 0,0005	1,73 ± 0,0005	1,97 ± 0,0029	2,40 ± 0,000
11A.2	2,94	2,70	2,78	0,00	5,03 ± 0,0069	0,43 ± 0,0005	0,17 ± 0,0009	3,20 ± 0,0008
11B.2	0,00	2,22	3,57	2,86	1,27 ± 0,0047	0,97 ± 0,0005	2,07 ± 0,0005	0,90 ± 0,000
1A.1-BA	9,09	3,13	0,00	0,00	3,33 ± 0,0111	3,37 ± 0,0082	0,10 ± 0,000	0,23 ± 0,0009
2B.2-BA	0,00	0,00	0,00	0,00	1,20 ± 0,000	1,50 ± 0,000	1,13 ± 0,0024	1,17 ± 0,0019
2C.1-BA	0,00	8,82	2,17	0,00	0,30 ± 0,000	1,37 ± 0,0024	1,23 ± 0,0033	0,63 ± 0,0005
3A.1-BA	0,00	0,00	0,00	0,00	2,90 ± 0,000	1,80 ± 0,0036	7,93 ± 0,0074	0,17 ± 0,0005
3A3A-BA	0,00	2,27	2,70	0,00	1,70 ± 0,000	1,83 ± 0,0005	3,07 ± 0,0033	0,53 ± 0,0005
3B.1-BA	0,00	4,65	4,76	2,33	8,40 ± 0,000	1,93 ± 0,0005	1,73 ± 0,0019	2,90 ± 0,0141
3B.2-BA	1,85	2,38	4,76	11,36	0,50 ± 0,000	2,60 ± 0,000	1,13 ± 0,0005	0,90 ± 0,000
6A.4-BA	0,00	2,27	2,38	0,00	7,53 ± 0,0074	1,53 ± 0,0026	0,47 ± 0,0005	1,07 ± 0,0009
6B1.2-BA	4,55	7,50	0,00	6,82	3,37 ± 0,0021	0,70 ± 0,000	3,83 ± 0,0005	0,40 ± 0,000
6C-BA	4,55	2,27	2,27	2,00	1,10 ± 0,0022	2,33 ± 0,0005	3,43 ± 0,0017	0,17 ± 0,0005
6C.2-BA	2,27	2,27	2,00	0,00	1,13 ± 0,0017	0,80 ± 0,000	4,17 ± 0,0009	2,77 ± 0,0005
7A.1-BA	2,22	0,00	0,00	0,00	0,30 ± 0,000	1,33 ± 0,0005	10,38 ± 0,0536	0,40 ± 0,0014
7B.4-BA	0,00	0,00	4,88	2,22	2,23 ± 0,0005	7,47 ± 0,0082	1,57 ± 0,0012	0,57 ± 0,0005
9A.2-BA	0,00	1,89	0,00	0,00	0,57 ± 0,0005	2,10 ± 0,0102	0,47 ± 0,0009	0,67 ± 0,0019
10C.3-BA	0,00	0,00	0,00	0,00	1,07 ± 0,0009	1,00 ± 0,0014	1,03 ± 0,0005	0,57 ± 0,0005

Continuação Tabela 10.

Isolados	E ₂₄ (%) Índice de emulsificação				Atividade emulsificante			
	Xileno	Tolueno	Benzeno	Querosene	Xileno	Tolueno	Benzeno	Querosene
10F.1-BA	0,00	2,27	0,00	0,00	1,30 ± 0,0028	4,87 ± 0,0178	8,97 ± 0,0017	0,67 ± 0,0005
10F.2-BA	18,18	9,09	2,27	52,27	0,67 ± 0,0009	5,63 ± 0,0005	3,80 ± 0,0008	0,77 ± 0,0019
10F.4-BA	0,00	0,00	0,00	0,00	5,90 ± 0,0016	13,63 ± 0,0061	0,57 ± 0,0009	0,30 ± 0,000
10F.6-BA	0,00	2,27	2,27	9,09	2,67 ± 0,0009	2,80 ± 0,0008	2,13 ± 0,0025	2,77 ± 0,0026
1A 1/2.1	0,00	0,00	0,00	0,00	1,60 ± 0,002	1,37 ± 0,0019	0,73 ± 0,0012	0,50 ± 0,0014

Segundo WILLUMSEN e KARLSON (1997) um critério utilizado para a capacidade emulsificante é manter pelo menos 50% do volume original da emulsão após 24 h. Os resultados observados (Figura 18) revelam que, a partir das cepas rastreadas, 10F2-BA apresentou resultados satisfatórios da atividade de emulsificação na presença do querosene 52,27%. SATPURE *et al.* (2008) afirmaram que a partir de um índice emulsificante de 30%, são comuns resultados positivos para testes qualitativos de *screening* primários. Logo, o teste de E₂₄ apresenta vantagens em relação aos outros testes por possuir caráter quantitativo, além de ser facilmente executado e apresentar resultados rapidamente (NWAGUMA *et al.*, 2016).

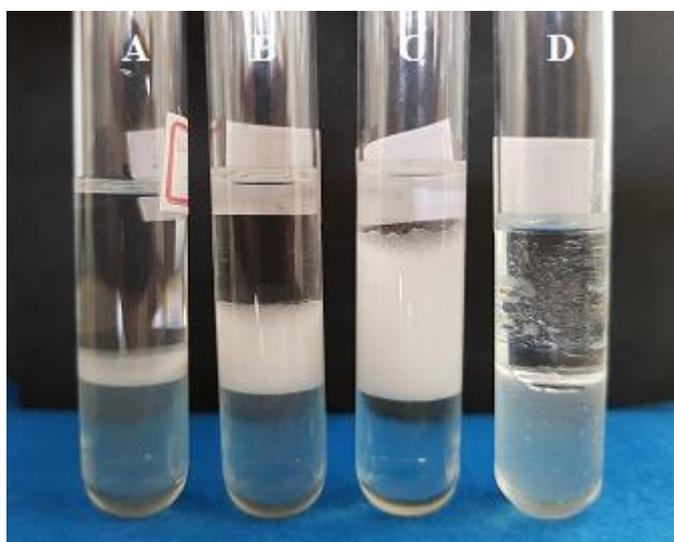


Figura 18: Teste do índice de emulsificação amostras 24 h após a agitação da amostra 10F2 para: a) tolueno, b) xileno; c) querosene; d) benzeno.

Segundo a metodologia de WALTER *et al.* (2010), embora o índice emulsificante seja considerado uma boa alternativa de *screening* primário, deve-se considerar que este método serve apenas como um indicativo da presença de biossurfactantes. Tal fato ocorre pois a tensão superficial e o índice emulsificante não necessariamente estarão sempre correlacionados.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos, conclui-se que a prospecção de microrganismos em amostras de sedimento de mangue com potencial para produzir moléculas surfactantes foi satisfatória, evidenciando linhagens de actinobactérias com capacidade emulsificante. Nove cepas obtidas da região que sofreu impacto ambiental apresentaram características com potencial biotecnológico, sendo a cepa (4B2- 13) a que apresentou uma maior redução na tensão superficial, para um valor de $31,53 \pm 0,52$ (56,51%). Entretanto, a maior redução encontrada durante os ensaios foi referente à amostra 10F.2-BA, cujo valor da tensão superficial resultou em $31,07 \pm 0,09$ (57,14 %). A atividade de emulsão do bio surfactante sobre quatro hidrocarbonetos testados (benzeno, tolueno, xileno e querosene) indicou a sua diversidade na aplicabilidade frente a diferentes poluentes hidrocarbonetos.

Os microrganismos isolados que apresentaram um potencial para produção de bio surfactantes foram os 1.2A5, 4B2, 4B6, 5A2, 5A3, 5A4, 10A11A6 e 11B2, referentes às coletas realizadas na 13 de Julho, e os 6C2 e 10F2, referentes às coletas do Porto das Cabras. Estes números evidenciam a teoria de que ambientes impactados possuem organismos mais aptos para produção de bio surfactantes, devido à diversidade de colônias bacterianas.

O meio seletivo foi adequado para o crescimento de actinobactérias, bem como para a realização do *screening* primário. Após todas as análises realizadas (colapso da gota, dispersão do óleo, tensão superficial, atividade emulsificante, capacidade emulsificante), foram identificadas as amostras 8C7, 6B1.2 e 10F2 como as que obtiveram maior capacidade de sintetizar moléculas surfactantes e emulsionar alguns hidrocarbonetos (benzeno, tolueno, xileno e querosene).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ABD EL-GAWAD, H. S. Oil and Grease Removal from Industrial Wastewater Using New Utility Approach. *Advances in Environmental Chemistry*, v. 2014, p. 1–6, 2014.

ADAMU, A., IJAH, U. J., RISKUWA, M. L., ISMAIL, H. Y., IBRAHIM, U. B. Study on Biosurfactant Production by Two Bacillus Species. *International Journal of Scientific Research in Knowledge*, v. 3, n. 1, p. 13–20, 1 jan. 2015.

ADEGBOYE, M. F.; BABALOLA, O. O. *Actinomycetes*: a yet inexhaustive source of bioactive secondary metabolites. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, 2013.

AL-AMOUDI, S., RAZALI, R., ESSACK, M., AMINI, M. S., BOUGOUFFA, S., ARCHER, J. A., LAFI, F. F., BAJIC, V. B. Metagenomics as a preliminary screen for antimicrobial bioprospecting. *Gene*, v. 594, n. 2, p. 248–258, 15 dez. 2016.

ANDRADE, J. DE A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética Química*, v. 35, n. 3, p. 17–43, set. 2010.

ANNA JOICE, P.; PARTHASARATHI, R. Production and characterization of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PBSC1 isolated from mangrove ecosystem. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 30, p. 6348–6353, 2014.

ARAUJO, L. V. DE; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. *Química Nova*, v. 36, n. 6, p. 848–858, 2013.

ARIECH, M.; GUECHI, A. Assessment of four different methods for selecting biosurfactant producing extremely halophilic bacteria. *African Journal of Biotechnology*, v. 14, n. 21, p. 1764–1772, 2015.

ARTOLA, P.-A., PEREIRA, F. E., ADJIMAN, C. S., GALINDO, A., MÜLLER, E. A., JACKSON, G., HASLAM, A. J. Understanding the fluid phase behaviour of crude oil: Asphaltene precipitation. *Fluid Phase Equilibria*, v. 306, n. 1, p. 129–136, 2011.

ATLAS R. 1997. Principles of microbiology. WCB McGraw-Hill, New York, NY.

AZMAN, A. S., OTHMAN, I., S VELU, S., CHAN, K. G., LEE, L. H. Mangrove rare

actinobacteria: Taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, n. AUG, p. 1–15, 2015.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 53, n. 5, p. 495–508, maio 2000.

BAO, M., PI, Y., WANG, L., SUN, P., LI, Y., CAO, L. Lipopeptide biosurfactant production bacteria *Acinetobacter* sp. D3-2 and its biodegradation of crude oil. *Environmental Science: Processes & Impacts*, v. 16, n. 4, p. 897, 2014.

BARKA, E. A., VATSA, P., SANCHEZ, L., GAVEAU-VAILLANT, N., JACQUARD, C., KLENK, H. P., CLÉMENT, C., OUHDOUCH, Y., VAN WEZEL, G. P. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of *Actinobacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 80, n. 1, p. 1–43, 25 mar. 2016.

BARROS, F. F. C., QUADROS, C. P. D., MARÓSTICA JÚNIOR, M. R., & PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 409–414, abr. 2007.

BARROS, F. F. C., SIMIQUELI, A. P. R., DE ANDRADE, C. J., PASTORE, G. M. Production of Enzymes from Agroindustrial Wastes by Biosurfactant-Producing Strains of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology research international*, v. 2013, p. 103960, 2013.

BASS, G. F., COLT, M. S., CHAVEZ, A. D., DEHOE, G. X., FORMAL, T. P., SEAVER, C. P., KHA, K., KELLEY, B. A., SCOTT, G.E., IMMOOS, C. E., COSTANZO, P. J. Synthetic design and investigation of novel polymeric surfactants. *Polymer*, v. 72, p. 301–306, 2015.

BEHERA, B. C., SINGDEVSACHAN, S. K., MISHRA, R. R., DUTTA, S. K., THATOI, H. N. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 3, n. 2, p. 97–110, abr. 2014.

BEHERA, B. C., SETHI, B. K., MISHRA, R. R., DUTTA, S. K., THATOI, H. N. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, dez. 2016.

BEVERIDGE, T. J. Use of the Gram stain in microbiology Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & histochemistry*, v. 295, n. June, 2000.

BHIMJI, S. S.; UNAKAL, C. G. Bacteria , Gram Positive Pathophysiology. p. 1–5, 2018.

BOUCHER, Y.; NESBØ, C. L.; DOOLITTLE, W. F. Microbial genomes: Dealing with diversity. *Current Opinion in Microbiology*, v. 4, n. 3, p. 285-289, 2001.

BRITO, E. M. S.; GUYONEAUD, R.; GOÑI-URRIZA, M.; RANCHOU-PEYRUSE, A.; VERBAERE, A.; CRAPEZ, M. A.; WASSERMAN, J. C.A.; DURAN, R. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Research in Microbiology*, v. 157, n. 8, p. 752–762, out. 2006.

BUSTAMANTE, M.; DURÁN, N.; DIEZ, M. C. Biosurfactants are useful tools for the bioremediation of contaminated soil: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v. 12, n. 124, p. 667–687, 2012.

CAI, Q.; ZHANG, B.; CHEN, B.; ZHU, Z.; LIN, W.; CAO, T. Screening of biosurfactant producers from petroleum hydrocarbon contaminated sources in cold marine environments. *Marine Pollution Bulletin*, v. 86, n. 1, p. 402–410, 2014.

CAMACHO-CHAB, J. C.; GUÉZENNEC, J.; CHAN-BACAB, M. J.; RÍOS-LEAL, E.; SINQUIN, C.; MUÑIZ-SALAZAR, R.; DE LA ROSA-GARCÍA, S. C.; REYES-ESTEBANEZ, M.; ORTEGA-MORALES, B. O. Emulsifying activity and stability of a non-toxic bioemulsifier synthesized by *Microbacterium* sp. MC3B-10. *International journal of molecular sciences*, v. 14, n. 9, p. 18959–72, 13 set. 2013.

CARRILLO, P. G.; MARDARAZ, C.; PITTA-ALVAREZ, S. I.; GIULIETTI, A. M. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 12, n. 1, p. 82–84, 1996.

CHAKRABORTY, S.; GHOSH, M.; CHAKRABORTI, S.; JANA, S.; SEN, K. K.; KOKARE, C.; ZHANG, L. Biosurfactant produced from *Actinomycetes nocardiosis* A17: Characterization and its biological evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 79, p. 405–412, 2015.

CHANDANKERE, R.; YAO, J.; CAI, M.; MASAKORALA, K.; JAIN, A. K.; CHOI, M. M.

Properties and characterization of biosurfactant in crude oil biodegradation by bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa. *Fuel*, v. 122, p. 140–148, 2014.

CHODAK, M.; GOŁĘBIEWSKI, M.; MORAWSKA-PŁOSKONKA, J.; KUDUK, K.; NIKLIŃSKA, M. Diversity of microorganisms from forest soils differently polluted with heavy metals. *Applied Soil Ecology*, v. 64, p. 7–14, 2013.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, n. 6, p. 915-929, dez. 2002.

COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. *VETOR-Revista de Ciências Exatas e Engenharias*, v. 13, n. 1, p. 85–104, 2003.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*, v. 53, n. 2, p. 224–9, fev. 1987.

CORREIA, R. R. S.; GUIMARÃES, J. R. D. Mercury methylation and sulfate reduction rates in mangrove sediments, Rio de Janeiro, Brazil: The role of different microorganism consortia. *Chemosphere*, v. 167, p. 438–443, jan. 2017.

COSTA, M. J. C.; DE SOUSA, J. T.; LEITE, V. D.; DA SILVA LOPES, W.; SANTOS, K. D. Co-Digestão anaeróbia de substâncias surfactantes, óleo e lodo de esgoto. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 12, n.4, p. 433–439, 2007.

DE, S.; MALIK, S.; GHOSH, A.; SAHA, R.; SAHA, B. A review on natural surfactants. *RSC Advances*, v. 5, n. 81, p. 65757–65767, 2015.

DE OLIVEIRA, D. W. F.; CARA, A. B., LECHUGA-VILLENA, M., GARCÍA-ROMÁN, M., MELO, V. M., GONÇALVES, L. R., & VAZ, D. A. Aquatic toxicity and biodegradability of a surfactant produced by *Bacillus subtilis* ICA56. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, v. 52, n. 2, p. 174–181, 2017.

DE SOUSA, T.; BHOSLE, S. Isolation and characterization of a lipopeptide bioemulsifier produced by *Pseudomonas nitroreducens* TSB.MJ10 isolated from a mangrove ecosystem. *Bioresource Technology*, v. 123, p. 256–262, 2012.

DECESARO, A.; RIGON, M. R.; THOMÉ, A.; COLLA, L. M. Produção de biossurfactantes

por microrganismos isolados de solo contaminados com óleo diesel. *Quimica Nova*, v. 36, n. 7, p. 947–954, 2013.

DEEPIKA, K. V.; KALAM, S.; SRIDHAR, P. R.; PODILE, A. R.; BRAMHACHARI, P. V. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KVD-HR42 using response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 5, p. 38–47, 2016.

DEEPIKA, K. V.; RAGHURAM, M.; BRAMHACHARI, P. V. Rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain KVD-HR42 isolated from oil contaminated mangrove sediments. *African Journal of Microbiology Research*, v. 11, n. 6, p. 218–231, 2017.

DEEPIKA, K. V.; RAMU SRIDHAR, P.; BRAMHACHARI, P. V. Characterization and antifungal properties of rhamnolipids produced by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain KVD-HM52. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 4, n. 4, p. 608–615, 2015.

DIAB, A.; EL DIN, S. G. Application of the biosurfactants produced by *Bacillus* spp. (SH 20 and SH 26) and *Pseudomonas aeruginosa* SH 29 isolated from the rhizosphere soil of an Egyptian salt marsh plant for the cleaning of oil-contaminated vessels and enhancing the biodegradation. *African Journal of Environmental Science and Technology*, v. 7, p. 671–679, 2013.

DOMINGOS, D. F.; DELLAGNEZZE, B. M.; GREENFIELD, P.; REYES, L. R.; MELO, I. S.; MIDGLEY, D. J.; OLIVEIRA, V. M. Draft genome sequence of *Bacillus pumilus* CCMA-560, isolated from an oil-contaminated mangrove swamp. *Genome Announcements*, v. 1, n. 5, p. 2013, 2013a.

DOMINGOS, D. F.; DELLAGNEZZE, B. M.; GREENFIELD, P.; REYES, L. R.; MELO, I. S.; MIDGLEY, D. J.; OLIVEIRA, V. M. Draft genome sequence of the biosurfactant-producing bacterium *Gordonia amicalis* strain CCMA-559, isolated from petroleum- impacted sediment. *Genome Announcements*, v. 1, n. 6, p. e000894-13, 2013b.

DOMINGOS, D. F.; DE FARIA, A. F.; DE SOUZA GALAVERNA, R.; EBERLIN, M. N.; GREENFIELD, P.; ZUCCHI, T. D.; MELO, I. S.; TRAN-DINH, N.; MIDGLEY, D.; DE OLIVEIRA, V. M. Genomic and chemical insights into biosurfactant production by the

mangrove-derived strain *Bacillus safensis* CCMA-560. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 7, p. 3155–3167, 2015.

EDWARDS, C. Isolation properties and potential applications of thermophilic actinomycetes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 42, n. 2–3, p. 161–179, ago. 1993.

FAGNANI, E.; GUIMARÃES, J. R.; MOZETO, A. A.; FADINI, P. S. Sulfetos volatilizáveis por acidificação e metais extraídos simultaneamente na avaliação de sedimentos de água doce. *Química Nova*, v. 34, n. 9, p. 1618–1628, 2011.

FERRADJI, F. Z.; MNIF, S.; BADIS, A.; REBBANI, S.; FODIL, D.; EDDOUAOUDA, K.; SAYADI, S. Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing *Streptomyces* spp. isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria). *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 86, p. 300–308, jan. 2014.

FOOLADI, T.; MOAZAMI, N.; ABDESHAHIAN, P.; KADIER, A.; GHOJAVAND, H.; YUSOFF, W. M. W.; HAMID, A. A. Characterization, production and optimization of lipopeptide biosurfactant by new strain *Bacillus pumilus* 2IR isolated from an Iranian oil field. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v. 145, p. 510–519, 2016.

GAGELIDZE, N. A.; AMIRANASHVILI, L. L.; VARSIMASHVILI, K. I.; TINIKASHVILI, L. M.; TOLORDAVA, L. L.; SADUNISHVILI, T. A. Selection of effective biosurfactant producers among *Bacillus* strains isolated from soils of Georgia. *Annals of Agrarian Science*, v. 14, n. 2, p. 72–75, 2016.

GAKPE, E.; RAHMAN, P. K. S. M.; HATHA, A. A. M. Microbial Biosurfactants – Review. *Journal of Marine and Atmospheric Research*, v. 3, p. 1–17, 2007.

GARCIA, E. S. Biodiversidade, biotecnologia e saúde. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 11, n. 3, p. 495–500, set. 1995.

GEETHA, I.; ARANA, R.; MANONMANI, A. M. Mosquitocidal *Bacillus amyloliquefaciens*: Dynamics of growth & production of novel pupicidal biosurfactant. *Indian Journal of Medical Research*, v. 140, n. September, p. 427–434, 2014.

GEETHA, I.; MANONMANI, A. M.; PRABAKARAN, G. *Bacillus amyloliquefaciens*: A mosquitocidal bacterium from mangrove forests of Andaman & Nicobar islands, India. *Acta*

Tropica, v. 120, n. 3, p. 155–159, 2011.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, v. 37, n. 1, p. 189–216, 1983.

GOVINDAMMAL, M. Effect of carbon and nitrogen sources on the production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens* isolated from mangrove ecosystem. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives*, v. 5, n. 2, p. 108–115, 2014.

GOVINDAMMAL, M.; PARTHASARATHI, R. Production and characterization of biosurfactant using renewable substrates by *Pseudomonas fluorescens* isolated from mangrove ecosystem. *Journal of Applicable Chemistry*, v. 2, n. 1, p. 55–62, 2013.

GRATIVOL, A. D.; MARCHETTI, A. A.; WETLER-TONINI, R. M.; VENANCIO, T. M.; GATTS, C. E.; THOMPSON, F. L.; REZENDE, C. E. Bacterial interactions and implications for oil biodegradation process in mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, v. 118, n. 1-2, p. 221-228, 2017.

HALLMANN, E.; MĘDRZYCKA, K. Wetting properties of biosurfactant (rhamnolipid) with synthetic surfactants mixtures in the context of soil remediation. *Annales UMCS, Chemia*, v. 70, n. 1, p. 29-39, 1 jan. 2015.

HOLMBERG, K. Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 6, n. 2, p. 148–159, 2001.

HUANG, H.; LV, J.; HU, Y.; FANG, Z.; ZHANG, K.; BAO, S. *Micromonospora rifamycinica* sp. nov., a novel actinomycete from mangrove sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, n. 1, p. 17–20, 2008.

INÈS, M.; DHOUHA, G. Glycolipid biosurfactants: Potential related biomedical and biotechnological applications. *Carbohydrate Research*, v. 416, p. 59–69, out. 2015.

ISAAC, V. J.; FERRARI, S. F. Assessment and management of the North Brazil Shelf Large Marine Ecosystem. *Environmental Development*, v. 22, p. 97–110, jun. 2017.

JIANG, X.-T.; PENG, X.; DENG, G. H.; SHENG, H. F.; WANG, Y.; ZHOU, H. W.; TAM, N. F. Y. Illumina sequencing of 16S rRNA tag revealed spatial variations of bacterial communities in a mangrove wetland. *Microbial Ecology*, v. 66, n. 1, p. 96–104, 7 jul. 2013.

JOY, S.; BUTALIA, T.; SHARMA, S.; RAHMAN, P. K. S. M. Biosurfactant producing bacteria from hydrocarbons contaminated environment. *Biodegradation and Bioconversion of Hydrocarbons*, v. n, p. 259-305, 2017.

JOY, S.; RAHMAN, P. K. S. M.; SHARMA, S. Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. *Chemical Engineering Journal*, v. 317, p. 232–241, jun. 2017.

KAMJAM, M.; SIVALINGAM, P.; DENG, Z.; HONG, K. Deep sea actinomycetes and their secondary metabolites. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. 760, p. 1-9 MAY, 2017.

KARIGAR, C. S.; RAO, S. S. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. *Enzyme research*, v. 2011, p. 805187, 2011.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, Brian. L. Biology of mangroves and mangrove Ecosystems. *Advances in Marine Biology*, v. 40, p. 81–251, 2001.

KHEIRALLA, Z. H.; ASHOUR, S. M.; RUSHDY, A. A.; AHMED, H. A. Characterization of biosurfactants produced by *Halobacillus dabanensis* and *Pontibacillus chungwhensi* isolated from oil-contaminated mangrove ecosystem in Egypt. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 49, n. 3, p. 263–269, 2013.

KHOPADE, A.; BIAO, R.; LIU, X.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. *Desalination*, v. 285, p. 198–204, jan. 2012.

KILCA, R. V.; COSTA, M. D. P.; ZANINI, R. R.; CARVALHO, F. A.; COSTA, A. F. Estrutura de manguezais em diferentes estágios sucessionais no estuário do rio piauí, Sergipe-brasil. *Pesquisas Botânicas*, v. 61, n. 61, p. 171–189, 2010.

KIM, S. B.; LONSDALE, J.; SEONG, C. N.; GOODFELLOW, M. *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family *Streptomycetaceae* (Waksman and Henrici (1943) ^{AL}) emend. Rainey et al. 1997. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 83, n. 2, p. 107–116, 2003.

KORAYEM, A. S.; ABDELHAFEZ, A. A.; ZAKI, M. M.; SALEH, E. A. Optimization of biosurfactant production by *Streptomyces* isolated from Egyptian arid soil using Plackett–

Burman design. *Annals of Agricultural Sciences*, v. 60, n. 2, p. 209–217, 1 dez. 2015.

KOSARIC, N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technology and Biotechnology*, v. 39, n. 4, p. 295-304, 2001.

KÜGLER, J. H.; KRAFT, A.; HEIBLER, S.; MUHLE-GOLL, C.; LUY, B.; SCHWACK, W.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Extracellular aromatic biosurfactant produced by *Tsukamurella pseudospumae* and *T. spumae* during growth on n-hexadecane. *Journal of Biotechnology*, v. 211, p. 107–114, 2015.

KUIPER, I.; LAGENDIJK, E. L.; PICKFORD, R.; DERRICK, J. P.; LAMERS, G. E.; THOMAS- OATES, J. E.; LUGTENBERG, B. J. J.; BLOEMBERG, G. V. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Molecular microbiology*, v. 51, n. 1, p. 97–113, jan. 2004.

KUMAR, A. P.; JANARDHAN, A.; RAO Y, J.; VISWANATH, B.; NARASIMHA, G. Production of biosurfactant from mangrove *Bacillus* sp. APK and their biodegradation studies. *New Horizons in Biotechnology*, p. 23–28, 2015.

KUMAR, A. P.; JANARDHAN, A.; VISWANATH, B.; MONIKA, K.; JUNG, J. Y.; NARASIMHA, G. Evaluation of orange peel for biosurfactant production by *Bacillus licheniformis* and their ability to degrade naphthalene and crude oil. *3 Biotech*, v. 6, n. 1, p. 43, 2016.

KUYUKINA, M. S.; IVSHINA, I. B.; PHILP, J. C.; CHRISTOFI, N.; DUNBAR, S. A.; RITCHKOVA, M. I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *Journal of microbiological methods*, v. 46, n. 2, p. 149–56, ago. 2001.

LEENHOUTS, J. M.; VAN DEN WIJNGAARD, P. W. J.; DE KROON, A. I. P. M.; DE KRUIJFF, B. Anionic phospholipids can mediate membrane insertion of the anionic part of a bound peptide. *FEBS Letters*, v. 370, n. 3, p. 189–192, 1995.

LEWIN, G. R.; CARLOS, C.; CHEVRETTE, M. G.; HORN, H. A.; MCDONALD, B. R.; STANKEY, R. J.; FOX, B. G.; CURRIE, C. R. Evolution and ecology of actinobacteria and their bioenergy applications. *Annual Review of Microbiology*, n. 70, p. 235–254, 2016.

LIANG, C.; KAO-KNIFFIN, J.; SANFORD, G. R.; WICKINGS, K.; BALSER, T. C.; JACKSON, R. D. Microorganisms and their residues under restored perennial grassland communities of varying diversity. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 103, p. 192–200, 2016.

LIU, B.; LIU, J.; JU, M.; LI, X.; YU, Q. Purification and characterization of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* Y-1 and its application in remediation of petroleum contaminated soil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 107, n. 1, p. 46–51, 2016.

LUDWIG W.; EUZEBY J.; SCHUMANN P.; BUSSE H.-J.; TRUJILLO M. E.; KÄMPFER P.; WHITMAN, W. B. Road map of the phylum Actinobacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer New York. p. 1–28, 2012.

MABROUK, M. I.; SALEH, N. M. Molecular identification and characterization of antimicrobial active *Actinomycetes* strains from Some Egyptian Soils. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci*, v. 14, n. 10, p. 954–963, 2014.

MADHU, A. N.; PRAPULLA, S. G. Evaluation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus plantarum* CFR 2194. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 172, n. 4, p. 1777–1789, 2014.

MAHAJAN, G. B.; BALACHANDRAN, L. Antibacterial agents from actinomycetes-a review. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, v. 4, p. 240-253, 2012

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Effects of various nutritional supplements on biosurfactant production by a strain of *Bacillus subtilis* at 45°C. *Journal of Surfactants and Detergents*, v. 5, n. 1, p. 11–17, jan. 2002.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 87–93, 2001.

MAO, X.; JIANG, R.; XIAO, W.; YU, J. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. *Journal of Hazardous Materials*, v. 285, p. 419–435, mar. 2015.

MARAGATHAM, I.; GOVINDAMMAL, M. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by Rhamnolipid produced by *Pseudomonas fluorescens* MFS-1 from Mangrove Soil. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, v. 5, n. 5, p. 135–140, 2014.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in Biotechnology*, v. 30, n. 11, p. 558–565, 2012.

MASON, O. U.; SCOTT, N. M.; GONZALEZ, A.; ROBBINS-PIANKA, A.; BÆLUM, J.; KIMBREL, J.; BOUSKILL, N. J.; PRESTAT, E.; BORGLIN, S.; JOYNER, D. C.; FORTNEY, J. L.; JURELICIUS, D.; STRINGFELLOW, W. T.; ALVAREZ-COHEN, L.; CHAZEN, T.; KNIGHT, R.; GILBERT, J. A.; JANSSON, J. K. Metagenomics reveals sediment microbial community response to Deepwater Horizon oil spill. *The ISME Journal*, v. 8, n. 7, p. 1464–1475, 23 jul. 2014.

MEENA, B.; RAJAN, L. A.; VINITHKUMAR, N. V.; KIRUBAGARAN, R. Novel marine actinobacteria from emerald Andaman & Nicobar Islands: a prospective source for industrial and pharmaceutical byproducts. *BMC Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 145, 2013.

MNIF, I.; SAHNOUN, R.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; GHRIBI, D. Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 109, p. 72–81, 2017.

MOUAFI, F. E.; ABO ELSOUD, M. M.; MOHARAM, M. E. Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. *Biotechnology Reports*, v. 9, p. 31–37, 2016.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, v. 133, n. 2, p. 183–198, 2005.

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

NETO, A. S. R.; CUNHA-LIGNON, M.; ARRUDA-REIS, M. C. C.; MEIRELES, A. J. A. The Ceará river mangrove's landscape (northeast Brazil) – comparative analyses of 1968 and 2009. *Journal of Coastal Research*, n. 64, p. 1802–1805, 2011.

NGUYEN, K. L.; NGUYEN, H. A.; RICHTER, O.; PHAM, M. T.; NGUYEN, V. P. Ecophysiological responses of young mangrove species *Rhizophora apiculata* (Blume) to different chromium contaminated environments. *Science of The Total Environment*, v. 574, p. 369–380, jan. 2017.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, v. 18, n. 5, p. 252–259, maio 2007.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, v. 25, n. 5, p. 772–776, set. 2002.

NWAGUMA, I.; CHIKERE, C.; OKPOKWASILI, G. Isolation, screening and identification of biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-polluted and pristine soils within Ogoniland, Nigeria. *British Microbiology Research Journal*, v. 15, n. 4, p. 1–11, 2016.

OLKOWSKA, E.; RUMAN, M.; POLKOWSKA, Z. Occurrence of surface active agents in the environment. *Journal of analytical methods in chemistry*, v. 2014, p. 769708, 16 jan. 2014.

PARIA, S. Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 138, n. 1, p. 24–58, abr. 2008.

PATIL, J. R.; CHOPADE, B. A. Studies on bioemulsifier production by *Acinetobacter* strains isolated from healthy human skin. *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, n. 2, p. 290–298, 2 ago. 2001.

PEELE, K. A.; CH, V. R. T.; KODALI, V. P. Emulsifying activity of a biosurfactant produced by a marine bacterium. *3 Biotech*, v. 6, n. 2, p. 177, dez. 2016.

PEREIRA, D. D. S. T.; SANTOS SILVA, A. L.; QUEIJEIRO LÓPEZ, A. M. Production of emulsifier by a strain of *Pseudomonas aeruginosa* (C1 LBPVMA-UFAL) using lubricant oil as main carbon source. *Acta Scientiarum Technology*, v. 32, n. 1, p. 33–36, 1 jan. 2010.

PEREIRA, J. F. B.; GUDIÑA, E. J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEIXEIRA, J. A.; COUTINHO, J. A.; RODRIGUES, L. R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*, v. 111, p. 259–268, 2013.

PI, Y.; BAO, M.; LIU, Y.; LU, T.; HE, R. The contribution of chemical dispersants and biosurfactants on crude oil biodegradation by *Pseudomonas* sp. LSH-7'. *Journal of Cleaner Production*, v. 153, p. 74–82, 2017.

PLAZA, G. A.; ZJAWIONY, I.; BANAT, I. M. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and

bioremediated soils. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v. 50, n. 1, p. 71–77, jan. 2006.

PRIYADARSHINI, A.; SINGDEVSACHAN, S. K.; TRIPATHY, S. K.; MOHANTA, Y. K.; PATRA, J. K.; SETHI, B. K. Isolation and identification of actinomycetes from mangrove soil and extraction of secondary metabolites for antibacterial activity. *British Biotechnology Journal*, v. 12, n. 2, p. 1–13, 2016.

PROSSER, J. I.; BOHANNAN, B. J. M.; CURTIS, T. P.; ELLIS, R. J.; FIRESTONE, M. K.; FRECKLETON, R. P.; GREEN, J. L.; KILLHAM, K.; LENNON, J. J.; OSBORN, A. M.; SOLAN, M.; VAN DER GAST, C. J.; YOUNG, J. P. W. The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, n. 5, p. 384–392, maio 2007.

RAJAN, B. M.; KANNABIRAN, K. Extraction and identification of antibacterial secondary metabolites from marine *Streptomyces* sp. VITBRK2. *International journal of molecular and cellular medicine*, v. 3, n. 3, p. 130–137, 2014.

ROCHA, L. L.; COLARES, G. B.; ANGELIM, A. L.; GRANGEIRO, T. B.; MELO, V. M. Culturable populations of *Acinetobacter* can promptly respond to contamination by alkanes in mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, v. 76, n. 1-2, p. 214–219, 2013.

RODRÍGUEZ-VALERA, F. Environmental genomics, the big picture?. *FEMS Microbiology Letters*, v. 231, n. 2, p. 153-158, 2004.

ROSZAKT, D. B.; COLWELL, R. R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological reviews*, v. 51, n. 3, p. 365–379, 1987.

SAIMMAI, A.; RUKADEE, O.; ONLAMOOL, T.; SOBHON, V.; MANEERAT, S. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by a new and promising strain of *Oleomonas sagaranensis* AT18. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n. 10, p. 2973–2986, 2012.

SAIMMAI, A.; ONLAMOOL, T.; SOBHON, V.; MANEERAT, S. An efficient biosurfactant-producing bacterium *Selenomonas ruminantium* CT2, isolated from mangrove sediment in south of Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 29, n. 1, p. 87–102, 2013.

SAIMMAI, A.; SOBHON, V.; MANEERAT, S. Molasses as a whole medium for biosurfactants production by *Bacillus* strains and their application. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 165, n. 1, p. 315–335, 2011.

SAIMMAI, A.; SOBHON, V.; MANEERAT, S. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Leucobacter komagatae* 183. *Annals of Microbiology*, v. 62, n. 1, p. 391–402, 2012.

SAIMMAI, A.; UDOMSILP, S.; MANEERAT, S. Production and characterization of biosurfactant from marine bacterium *Inquilinus limosus* KB3 grown on low-cost raw materials. *Annals of Microbiology*, v. 63, n. 4, p. 1327–1339, 2013.

SAJNA, K. V.; SUKUMARAN, R. K.; GOTTUMUKKALA, L. D.; PANDEY, A. Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 or its culture broth. *Bioresource Technology*, v. 191, p. 133–139, 2015.

SAN KESKIN, N. O.; HAN, D.; OZKAN, A. D.; ANGUN, P.; UMU, O. C. O.; TEKINAY, T. Production and structural characterization of biosurfactant produced by newly isolated *Staphylococcus xylosus* STF1 from petroleum contaminated soil. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v. 133, p. 689–694, 2015.

SANTOS, D. K. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *International journal of molecular sciences*, v. 17, n. 3, p. 401, 18 mar. 2016.

SANTOS, H. F.; CARMO, F. L.; PAES, J. E.; ROSADO, A. S.; PEIXOTO, R. S. Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 216, n. 1–4, p. 329–350, 13 mar. 2011.

SANTOS, L. C. M.; MATOS, H. R.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CUNHA-LIGNON, M.; BITENCOURT, M. D.; KOEDAM, N.; DAHDOUH-GUEBAS, F. Anthropogenic activities on mangrove areas (São Francisco River Estuary, Brazil Northeast): A GIS-based analysis of CBERS and SPOT images to aid in local management. *Ocean & Coastal Management*, v. 89, p. 39–50, mar. 2014.

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 Sciences*, v. 37, n. 3, p. 243–250, 2008.

SILVA, R. D. C. F. S.; ALMEIDA, D. G.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. *International journal of molecular sciences*, v. 15, n. 7, p. 12523–12542, 15 jul. 2014.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, v. 25, n. 1, p. 99–121, jan. 2007.

SIVAPERUMAL, P.; KAMALA, K.; RAJARAM, R. Bioremediation of industrial waste through enzyme producing marine microorganisms. In: *Advances in Food and Nutrition Research*. Academic Press, v. 80p. 165–179, 2017.

SOBRINHO, H. B. S.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SALGUEIRO, A. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; LEITE, L. F.; SARUBBO, L. A. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. *Process Biochemistry*, v. 43, n. 9, p. 912–917, set. 2008.

SOBRINHO, H. B.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; PORTO, A. L. F.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: Classification, properties and environmental applications. *Recent Developments in Biotechnology*, v. 11, p. 1-29, 2014.

SOLECKA, J.; ZAJKO, J.; POSTEK, M.; RAJNISZ, A. Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Open Life Sciences*, v. 7, n. 3, p. 373–390, 2012.

SOUZA, M. R. R.; SANTOS, E.; SUZARTE, J. S.; CARMO, L. O.; FRENA, M.; DAMASCENO, F. C.; ALEXANDRE, M. R. Concentration, distribution and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in Poxim River sediments, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 127, p. 478–483, fev. 2018.

TANG, C.; QIU, F.; ZHAO, X. Molecular design and applications of self-assembling surfactant-like peptides. *Journal of Nanomaterials*, v. 2013, p. 15, 2013.

TOMREN, A. L.; BARTH, T. Comparison of partial least squares calibration models of viscosity, acid number and asphaltene content in petroleum, based on GC and IR data. *Fuel*, v.

120, p. 8–21, 2014.

TONINI, R. M. C. W.; DE REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: Revisão. *Oecologia Australis*, v. 14, n. 4, p. 1025–1035, 2010.

UZOIGWE, C.; BURGESS, J. G.; ENNIS, C. J.; RAHMAN, P. K. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Frontiers in microbiology*, v. 6, p. 245, 2015.

VALENCIA, E. Y.; CHAMBERGO, F. S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. *Fungal Genetics and Biology*, v. 60, p. 9–18, 2013.

VANNUCCI, M. What is so special about mangroves?. *Brazilian Journal of Biology*, v. 61, n. 4, p. 599–603, nov. 2001.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; VAN SINDEREN, D. Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 71, n. 3, p. 495–548, 2007.

VIGNESHWARAN, C.; VASANTHARAJ, M. J. K.; SIVASUBRAMANIAN, V. A review on biosurfactants and its environmental applications. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, v. 10, n. 8, p. 152–160, 2016.

WALTER, V.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Advances in experimental medicine and biology*, v. 672, p. 1–13, 2010.

WALTER, V.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms. In *Biosurfactants* (p. 1-13). Springer, New York, NY. 2013.

WANAPAIKAN, P.; LAOTHAMTEEP, N.; VEJARANO, F.; CHAKRABORTY, J.; SHINTANI, M.; MUANGCHINDA, C.; MORITA, T.; SUZUKI-MINAKUCHI, C.; INOUE, K.; NOJIRI, H.; PINYAKONG, O. Synergistic degradation of pyrene by five culturable bacteria in a mangrove sediment-derived bacterial consortium. *Journal of Hazardous*

Materials, v. 342, p. 561–570, 2018.

WANG, L.; HUANG, X.; ZHENG, T.-L. Responses of bacterial and archaeal communities to nitrate stimulation after oil pollution in mangrove sediment revealed by Illumina sequencing. *Marine Pollution Bulletin*, v. 109, n. 1, p. 281–289, 2016.

WANG, X.; CAI, Z.; ZHOU, Q.; ZHANG, Z.; CHEN, C. Bioelectrochemical stimulation of petroleum hydrocarbon degradation in saline soil using U-tube microbial fuel cells. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 109, n. 2, p. 426–433, fev. 2012a.

WANG, Z.-Y.; XU, Y.; WANG, H.-Y.; ZHAO, J.; GAO, D.-M.; LI, F.-M.; XING, B. Biodegradation of crude oil in contaminated soils by free and immobilized microorganisms. *Pedosphere*, v. 22, n. 5, p. 717–725, out. 2012b.

WEI, Y.-H.; CHOU, C.-L.; CHANG, J.-S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, v. 27, n. 2, p. 146–154, 2005.

WILHELM, M. J.; SHEFFIELD, J. B.; SHARIFIAN GH, M.; WU, Y.; SPAHR, C.; GONELLA, G.; XU, B.; DAI, H.-L. Gram's Stain Does Not Cross the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *ACS Chemical Biology*, v. 10, n. 7, p. 1711–1717, 2015.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*, v. 7, n. 5, p. 415–423, 1997.

WOHL, D. L.; MCARTHUR, J. V. Actinomycete-flora associated with submersed freshwater macrophytes. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 26, n. 2, p. 135–140, jun. 1998.

WONGWONGSEE, W.; CHAREANPAT, P.; PINYAKONG, O. Abilities and genes for PAH biodegradation of bacteria isolated from mangrove sediments from the central of Thailand. *Marine Pollution Bulletin*, v. 74, n. 1, p. 95–104, 2013.

XIA, W.-J.; DONG, H. P.; YU, L.; YU, D. F. Comparative study of biosurfactant produced by microorganisms isolated from formation water of petroleum reservoir. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 392, n. 1, p. 124–130, 2011.

XU, J. Biomolecules produced by mangrove-associated microbes. *Current medicinal*

chemistry, v. 18, n. 34, p. 5224-5266, 2011.

YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; KNAPP, R. M.; MCINERNEY, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, v. 56, n. 3, p. 339–347, 2004.

ZAMBRY, N. S.; AYOIB, A.; NOH, N. A. M.; YAHYA, A. R. M. Production and partial characterization of biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. R1. *Bioprocess and biosystems engineering*, v. 40, n. 7, p. 1007-1016, 2017.