

Eixo Temático ET-03-014 - Meio Ambiente e Recursos Naturais

## TRIAGEM DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMBIENTE MARINHO PARA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

Iasmin Cartaxo Taveira<sup>1</sup>, Krystyna Gorlach-Lira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduanda do Curso de Biotecnologia/UFPB; <sup>2</sup>Orientadora/Professora do Departamento de Biologia Molecular/UFPB

### RESUMO

O ambiente marinho apresenta as populações microbianas submetidas a diversas condições adversas. Dessa forma, esses ambientes possuem nichos diversificados, cujos microrganismos apresentam alta diversidade bioquímica. Há poucos estudos sobre prospecção das bactérias isoladas dos cnidários, no entanto, recentemente houve um aumento das pesquisas sobre os compostos bioativos produzidos por estes microrganismos. Dentre esses compostos, têm-se os biossurfactantes, os quais são metabólitos secundários com atividade superficial, que apresentam diversas aplicações industriais e biotecnológicas. Neste trabalho foram analisados 22 isolados de bactérias isoladas do tecido do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* dos recifes de corais de Carapibus (Paraíba) com relação à produção de biossurfactantes. Para isso, foram realizados os testes de emulsificação e dispersão do óleo diesel e teste de atividade hemolítica dos isolados bacterianos. Dentre as bactérias analisadas seis isolados (27%) foram capazes de produzir emulsões estáveis quando testadas com cultura. Apenas um isolado apresentou capacidade de produzir emulsões estáveis a partir do sobrenadante livre de células. As culturas de todos os isolados foram capazes de promover dispersão do óleo diesel e 20 isolados (91%) apresentaram a dispersão do óleo diesel utilizando sobrenadante livre de células. Os resultados positivos obtidos para testes com sobrenadante livre de células indicam a produção de biossurfactantes extracelulares. No teste de atividade hemolítica 12 isolados apresentaram resultados positivos, produzindo zonas de hemólise de 20 a 56 mm. O isolado que apresentou o maior halo de hemólise (56 mm) foi o isolado PN79 do gênero *Bacillus*. Os resultados obtidos mostraram que o isolado PS41 do gênero *Vibrio* foi o mais promissor quanto à produção de biossurfactantes, apresentando mais alto índice de emulsificação do óleo diesel (40%) e maior zona de dispersão de óleo diesel (30 mm). Além disso, esse isolado demonstrou uma relevante capacidade de produzir biossurfactantes extracelulares. As pesquisas futuras sobre as bactérias analisadas neste trabalho são necessárias para otimização das condições de cultivo para maior produção de biossurfactantes.

**Palavras-chave:** Bactérias; Biossurfactantes; Óleo diesel.

### INTRODUÇÃO

O ambiente marinho apresenta as populações microbianas submetidas a condições extremas de temperatura, pressão, salinidade e disponibilidade de nutrientes. Assim, os microrganismos que são capazes de sobreviver nos diversos nichos dos ambientes marinhos são susceptíveis de ser altamente diversificados e de possuir novas e potencialmente únicas propriedades bioquímicas (JACKSON et al., 2015).

Os microrganismos associados aos organismos recifais utilizam os nutrientes produzidos por seus hospedeiros e em troca secretam vários metabólitos biologicamente ativos como vitaminas, enzimas e substâncias antimicrobianas, que podem ser úteis para nutrição ou proteção do organismo hospedeiro e que na maioria das vezes são quimicamente diferentes dos encontrados em ambientes terrestres (MARHAVER et al., 2008; ROHWER; KELLEY, 2004; LANE; KUBANEK, 2008).

Relativamente poucos estudos foram voltados para explorar as bactérias cultiváveis isoladas dos cnidários, sendo que nos últimos anos houve um aumento das pesquisas sobre os

compostos bioativos produzidos por estes microrganismos (HOU et al., 2015; PHAM et al., 2016).

Surfactantes são importantes produtos químicos utilizados pela indústria em vários setores, consistem em moléculas anfipáticas com ambas as regiões hidrofílica e hidrofóbica que formam um agregado com interfaces entre fluidos com polaridades diferentes, apresentando capacidade de diminuir a tensão superficial e de emulsificação.

Os surfactantes sintéticos são usualmente classificados de acordo com o grupo polar, já os biosurfactantes, aqueles surfactantes que são produzidos por microrganismos, são classificados de acordo com sua natureza química. Essas substâncias são metabólitos secundários com atividade superficial (ZAMBRY et al., 2017), que podem ser agrupadas em diversas classes, podendo ter diversas aplicações.

Algumas das classes bem estabelecidas são os glicolipídeos; as lipoproteínas ou lipopeptídeos; fosfolipídeos, ácidos graxos ou lipídeos naturais; biosurfactantes poliméricos; e biosurfactantes particulados (VARJANI; UPASANI, 2017). Estes compostos consistem em um grupo de moléculas anfipáticas formadas como metabólitos secundários, tem estrutura química diversificada e desempenham papéis essenciais a sobrevivência dos microrganismos que as produzem (GUDINĂ et al., 2013).

Fisiologicamente, a função dos biosurfactantes ainda não foi completamente elucidada, porém algumas funções vêm sendo atribuídas a eles, como: atividade antimicrobiana, visto que podem inibir a formação do biofilme; emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos e outros compostos insolúveis em água (NITSCHKE; PASTORE, 2002; VAN HAMME et al., 2006).

Os biosurfactantes apresentam inúmeras vantagens sobre os seus homólogos químicos (APARNA et al., 2012; PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011), sendo amplamente utilizados em muitos ramos da indústria, tais como a agrícola, alimentícia, química, farmacêutica e de cosméticos (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011). Biosurfactantes produzidos por microrganismos marinhos podem ser muito úteis nas estratégias de biorremediação de água do mar contaminadas com petróleo, por exemplo (JACKSON et al., 2015).

Apesar de ter grande potencial de aplicabilidade em diversos setores, os biosurfactantes, possuem elevado custo de produção o que restringe seu uso industrial (MAGALHÃES, 2012). Tendo em vista que esses compostos podem ainda ser sintetizados de forma intracelular ou extracelular (ARAÚJO, 2017 apud PINTO; MARTINS; COSTA, 2009) e que os processos de downstream encarecem a produção de biosurfactantes, encontrar microrganismos capazes de produzir biosurfactantes extracelulares estáveis é um bom meio de cortar custos de produção.

## **OBJETIVOS**

A presente pesquisa teve a finalidade de avaliar a capacidade de bactérias isoladas do tecido do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* dos recifes de corais de Carapibus (Paraíba) para produção de biosurfactantes e, dessa forma, selecionar os isolados mais promissores para uso biotecnológico e processos de biorremediação.

## **METODOLOGIA**

### **Microrganismos**

Neste trabalho foram utilizados 22 isolados da coleção de bactérias isoladas do tecido do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* dos recifes de corais de Carapibus localizados no estado da Paraíba. A coleção de bactérias provenientes destas espécies foi obtida nos trabalhos de Silva (2015) realizados no Laboratório de Biologia de Microrganismos (BIOMICRO/DBM/CCEN/UFPB).

### **Cultivo das bactérias**

Todos os isolados foram previamente inoculados e purificados em meio Agar Nutriente (HiMedia). As culturas foram incubadas por 24 h a 37 °C.

Para os testes de produção de biossurfactantes foi utilizado Caldo nutriente com adição de 100 µL de óleo diesel.

#### **Análise de produção de biossurfactantes**

Os isolados de bactérias foram avaliados com relação à capacidade de produzir biossurfactantes utilizando os seguintes testes: dispersão do óleo diesel, emulsificação do óleo diesel e teste de hemólise.

#### **Teste de emulsificação**

Os isolados foram inoculados em meio Caldo Nutriente contendo 100 µL de óleo diesel sem aditivos e cultivados por 15 dias à 37°C, sob agitação.

O teste foi realizado utilizando cultura e o sobrenadante livre de células. Para obter o sobrenadante, uma alíquota de 5 mL da cultura foi centrifugada à 6000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante livre de células foi testado para avaliar a produção de biossurfactantes extracelulares.

As alíquotas de 2 mL de cultura ou de sobrenadante foram colocadas em tubos de ensaio. Aos tubos foram adicionados 2 mL de óleo diesel sem aditivos e foi realizada agitação no vórtex por 2 minutos a fim de promover a emulsificação. Após 5 minutos (E5) e 24 horas (E24) de repouso foram feitas medições da altura da camada emulsificada e da altura total da coluna líquida (GAYLARDE, 2000; LEITE et al., 2015).

Os índices de emulsificação E5 (%) e E24 (%) foram calculados dividindo-se a altura da camada emulsificada pela altura total da coluna líquida multiplicado por 100. A razão entre os índices E24 e E5 foi utilizada para calcular a estabilidade da emulsão. Os resultados foram considerados positivos com os índices de emulsão superiores a 5%.

Esse teste foi realizado em duplicata e o SDS (1%) foi usado como controle positivo.

#### **Método de dispersão do óleo diesel**

Esse teste foi realizado seguindo a metodologia de Youssef et al. (2004). À uma placa de Petri foi adicionada água destilada. Em seguida, foram adicionados à superfície da água 100 µL de óleo diesel sem aditivos. Para execução do teste foi utilizado 10 µL de cultura ou de sobrenadante livre de células, obtido pela centrifugação da cultura (item 3.3.1).

Após adição de amostra na superfície do óleo diesel foi observada a formação de zona de dispersão do óleo. O SDS (1%) foi utilizado como controle positivo.

#### **Teste de atividade hemolítica**

As bactérias foram inoculadas em meio Agar Sangue (HiMedia) com 5% de sangue de coelho desfibrinado e cultivadas por 24 horas à 37°C. Foram inoculados 4 isolados por placa de Petri. O teste foi realizado em duplicata.

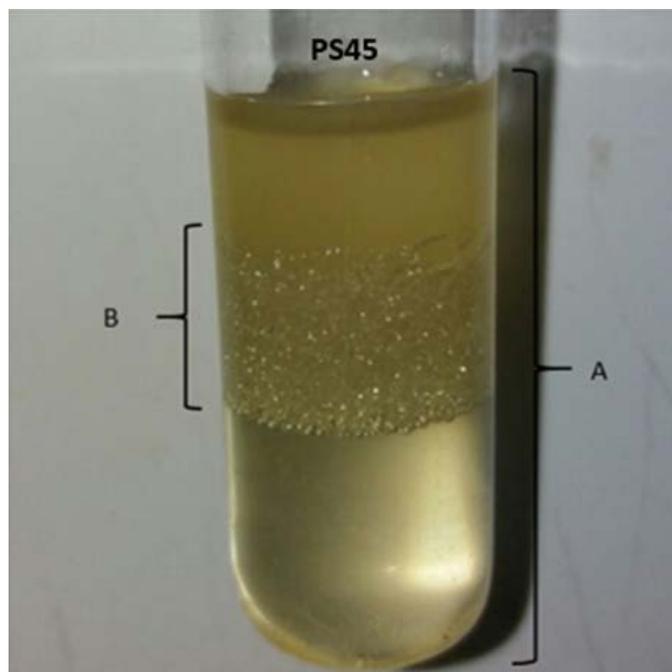
### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os 22 isolados analisados neste trabalho pertenceram aos gêneros: *Bacillus*, *Vibrio*, *Marinobacter*, *Alteromonas* e *Staphylococcus*.

A produção de biossurfactantes foi avaliada através técnicas de triagem para seleção de microrganismos com potencial para produção de biossurfactantes. Os 22 isolados foram testados quanto a capacidade de produzir emulsão e promover dispersão de óleo diesel, bem como foi avaliada a produção de zonas de hemólise. Os isolados de bactérias pertenceram aos seguintes gêneros: *Bacillus* (14 isolados), *Vibrio* (4 isolados), *Alteromonas* (2 isolados), *Marinobacter* (1 isolado) e *Staphylococcus* (1 isolado).

Dentre as bactérias testadas 6 isolados (27%) foram capazes de produzir emulsões estáveis quando testadas com cultura (Fig.1), e apenas 1 isolado (5%) apresentou capacidade de produzir emulsões estáveis usando tanto cultura como o sobrenadante livre de células (Tabela 1). Enquanto que todos os isolados foram capazes de promover alguma dispersão do óleo diesel quando foi usado a amostra com cultura e 20 isolados (90,9%) foram capazes de dispersar o

óleo diesel quando foi utilizado o sobrenadante livre (Tabela 1). A capacidade de promover emulsificação do óleo diesel de modo estável foi observada em alguns isolados dos gêneros: *Vibrio*, *Staphylococcus* e *Bacillus* (Tabela 1).



**Figura 1.** Resultado do teste de emulsificação para o isolado PS45 do gênero *Bacillus*. Fonte: Iasmin Cartaxo Taveira

O isolado mais promissor para produção de emulsões foi o PS41 pertencente ao gênero *Vibrio* (Tabela 1). Esse isolado apresentou índices de emulsificação após 24 horas (E24) de 25% e 40% no teste realizado com cultura e com sobrenadante livre, respectivamente, e foi único capaz de produzir biossurfactantes extracelulares.

Sabe-se ainda que o teste de emulsificação pode não indicar a produção de biossurfactantes de fato, e ao invés disso indicar a produção de bioemulsificantes, haja vista que todos os biossurfactantes são bioemulsificantes, mas não necessariamente vice versa (VARJANI; UPASANI, 2017). Por isso, outro dado interessante consiste na capacidade, tanto do isolado PS41 quanto dos isolados do gênero *Staphylococcus* (PS19) e *Bacillus* (PS4 e PS45), os quais apresentaram altos valores de emulsificação e de dispersão de óleo diesel (Tabela 1).

**Tabela 1.** Análise de produção de biossurfactantes por bactérias: teste de emulsificação; teste de dispersão de óleo diesel; teste de atividade hemolítica.

Gênero/Isolado <sup>a</sup>	Teste de Emulsificação						Teste de Dispersão de Óleo Diesel		Zona de Hemólise (mm)
	Cultura			Sobrenadante			Cultura	Sobrenadante	
	E5%	E24%	ES	E5%	E24%	ES			
<b><i>Vibrio</i></b>									
PS39 <i>V. natriegens</i>	27,58	-	-	-	-	-	6,6	-	39
PS41 <i>V. alginolyticus</i>	46,42	25	0,5	56	40	0,7	30	30	N.D.
PN25 <i>V. proteolyticus</i> / <i>V. vulnificus</i>	25,75	-	-	29	-	-	22,5	8,75	-
PN19 <i>V. alginolyticus</i> / <i>parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	18,5	20	26
<b><i>Alteromonas</i></b>									
PN51 <i>A. macleodii</i> / <i>A. simiduii</i>	31,81	-	-	22,58	-	-	15	10	35
PN12 <i>A. macleodii</i> / <i>A. simiduii</i>	29,62	-	-	-	-	-	30	30	21
<b><i>Marinobacter</i></b>									
PN6 <i>M. santoriniensis</i>	42,85	-	-	-	-	-	16,6	18,3	40
<b><i>Staphylococcus</i></b>									
PS19 <i>S.aureus</i> / <i>S. simiae</i>	18,51	18,51	1	30,76	-	-	22,25	21,6	-
<b><i>Bacillus</i></b>									
PN87 <i>B. aerius</i> / <i>B. stratosphericus</i>	-	-	-	-	-	-	16,6	13,75	22
PS4 <i>B. aerius</i> / <i>B. stratosphericus</i>	30	24	0,8	6	-	-	15	-	-
PS10 <i>B. aerius</i> / <i>B. stratosphericus</i>	7,6	7,6	1	-	-	-	23,75	25	-
PS42 <i>B. aerius</i> / <i>B. stratosphericus</i>	36,66	-	-	6	-	-	20	21,16	-

PS44									
<i>B. aerius/B. stratosphericus</i>	20	-	-	-	-	-	15	12,5	-
PS45									
<i>B. aerius/B. stratosphericus</i>	40	16,66	0,41	36,66	-	-	25,6	17,5	N.D.
PS63									
<i>B. aerius/B. stratosphericus</i>	24,13	-	-	29	-	-	21	18,3	40
PS65									
<i>B. aerius/B. stratosphericus</i>	-	-	-	-	-	-	15	11,3	-
PS86									
<i>B. aerius/B. stratosphericus</i>	-	-	-	21,42	-	-	20	15	-
PN72									
<i>B. pumilus /B.safensis</i>	-	-	-	-	-	-	13	20	-
PN74									
<i>B. pumilus/B. safensis</i>	12	-	-	-	-	-	8	17,5	20
PN79									
<i>B. pumilus/B. safensis</i>	7	-	-	-	-	-	27,5	23,3	56
PN82									
<i>B. pumilus/B. safensis</i>	-	-	-	48,14	-	-	15	30	48
PN95									
<i>B. pumilus/B. safensis</i>	23	7	0,3	16,66	-	-	2,5	1,5	50

a – Alinhamento mais significativo e similaridade com a sequência do gene RNAr 16S (Silva, 2015).  
Fonte: Pesquisa Direta. 2016/2017.

A evidência da produção de biossurfactantes pelo isolado PS41 é um dado interessante, por sua vez, haja vista que há poucos relatos de bactérias do gênero *Vibrio* como bons produtores de biossurfactantes. No entanto, têm sido relatados que isolados desse gênero, advindos de ambientes marinhos, apresentam alto potencial para produção de biossurfactantes.

Foi observado que um isolado *Vibrio* sp., em meio mineral enriquecido com 1% de óleo diesel, se destacou nos testes de triagem, apresentando índices de emulsão (E24) de até 32,5% (GRAZIANO et al., 2016).

É sabido que diferentes parâmetros devem ser levados em consideração para produção de biossurfactantes. Tais como temperatura, quantidade de meio, pH, agitação e aeração, salinidade, concentração de íons, fontes de nitrogênio e fontes de carbono (HU, WANG e WANG, 2015; CARVALHO, 2012). Dessa forma, é possível perceber que, além dos parâmetros físicos, o conteúdo do meio de cultivo é essencial para produção de biossurfactantes.

Hu et al. (2015) observaram que uma linhagem de *Vibrio* sp. foi capaz de produzir diferentes zonas de dispersão de óleo diesel, chegando a 65mm, dependendo das condições de cultivo.

Meios minerais suplementados com fontes de carbono, como o óleo diesel, têm sido muito indicados para otimização da produção de biossurfactantes. No entanto, as condições de cultivo dependem do microrganismo estudado. Por exemplo, Hu et al. (2015) constatou que o melhor meio para a produção de biossurfactante pelo *Vibrio* spp. foi o meio composto por 0,5% de lactose, 1,1% de extrato de levedura, 2% de cloreto de sódio e 0,1% de hidrogenofosfato dissódico.

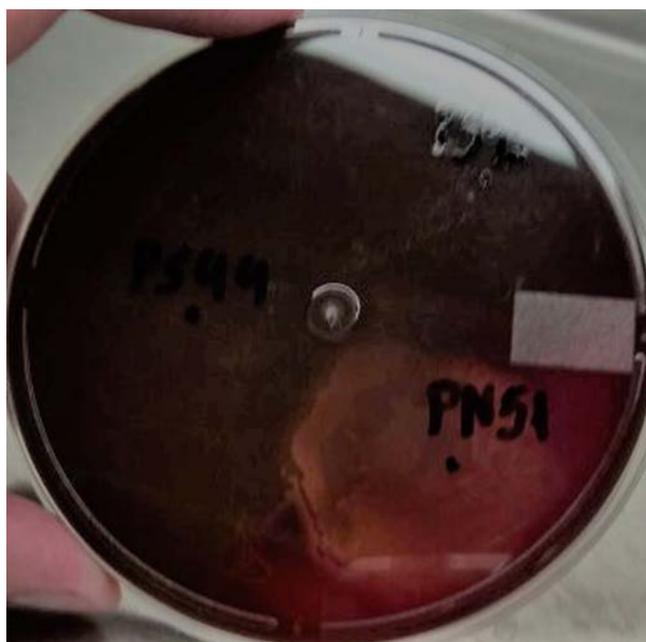
A produção de biossurfactantes observada por bactérias do gênero *Bacillus* vem sendo largamente discutida. Jemil et. al. (2016), mostra que o isolado *B. methylotrophicus* DCS1 teve

alto potencial para produção de biossurfactantes, apresentando índice de emulsificação E24 de 60%, quando cultivado em meio mineral com 2% de óleo diesel como única fonte de carbono. Portanto, tais evidências sugerem que os resultados obtidos no presente trabalho podem ser otimizados variando meios de cultura e os parâmetros físico-químicos de cultivo.

Além disso, nesse estudo foi avaliada a produção de biossurfactantes intra e extracelulares, de modo que realizamos os teste de emulsificação e dispersão de óleo diesel com cultura e sobrenadante livre de células. O isolado PS41 teve, portanto, grande destaque devido a percepção de sua capacidade de produzir biossurfactantes extracelulares, sendo capaz de produzir um alto E24% e uma zona de dispersão de óleo diesel de 30 mm (a maior dentre os isolados estudados), quando foi utilizado o sobrenadante livre de células.

Tal evidência permite inferir seu alto potencial biotecnológico, pois, além de esse isolado pertencer à um gênero pouco discutido na literatura como bom produtor de biossurfactantes (*Vibrio*), ele também é capaz de produzi-los extracelularmente. O que implica que, em escala de produção industrial, há uma redução dos custos de recuperação do produto, isso é primordial para reduzir o custo total da produção (ZAMBRY et al., 2017).

No teste de atividade hemolítica 12 isolados apresentaram resultados positivos (Figura 2), produzindo zonas de hemólise de 20 a 56 mm (Tabela 1). O isolado que apresentou o maior halo de hemólise no presente estudo foi o isolado PN79 (*Bacillus*), sendo este de 56mm (Tabela 1). Outros isolados do gênero *Bacillus* tiveram destaque, bem como os isolados dos gêneros *Marinobacter* (PN6) e *Alteromonas* (PN51). Jemil et. al. (2016), obteve resultados bastante inferiores, as zonas de hemólise obtidos em sua pesquisa variaram de 15 até 28mm, já as zonas do presente estudo variaram de 20 até 56mm.



**Figura 2.** Atividade hemolítica presente no isolado PN51. Fonte: Iasmin Cartaxo

Não foi possível determinar com certeza a presença ou ausência de atividade hemolítica do isolado PS41, sendo necessária a repetição desse teste. Isso é sustentado pela presença de atividade hemolítica em um isolado do mesmo gênero no presente estudo (PS39) e devido a evidência na literatura de esse isolados da espécie do PS41 (*V. alginolyticus*) de possuir atividade hemolítica bem estabelecida (BUNPA; SERMWITTAYAWONG; VUDDHAKUL, 2016). Alguns isolados que também demonstraram potencial na produção de biossurfactantes em outros testes não apresentaram atividade hemolítica como o isolado PS4 (*Bacillus*) e o PS19 (*Staphylococcus*).

Alguns autores têm discutido sobre a capacidade de triagem do teste de atividade hemolítica. Eles divergem sugerindo que esse não é um método confiável para o rastreamento de produtores de biossurfactantes, enquanto outros recomendam o ensaio hemolítico como um método de triagem preliminar que deve ser apoiado por outras técnicas baseadas em medidas de atividade superficial (VARJANI; UPASANI, 2017).

## CONCLUSÕES

Dentre as bactérias analisadas seis isolados (27%) foram capazes de produzir emulsões estáveis quando testadas com cultura. Apenas um isolado apresentou capacidade de produzir emulsões estáveis a partir do sobrenadante livre de células. As culturas de todos os isolados foram capazes de promover dispersão do óleo diesel e 20 isolados (91%) apresentaram a dispersão do óleo diesel utilizando sobrenadante livre de células. Os resultados positivos obtidos para testes com sobrenadante livre de células indicam a produção de biossurfactantes extracelulares.

Os resultados obtidos mostraram que o isolado PS41 do gênero *Vibrio* é o mais promissor quanto à produção de biossurfactantes. Isso deve-se ao fato desse isolado apresentar os valores altos de índice de emulsificação e dispersão do óleo diesel. Além disso, ele demonstrou uma relevante capacidade de produzir biossurfactantes extracelulares.

Ainda é necessário promover a otimização das condições de cultivo (fontes de carbono e nitrogênio, pH, temperatura, salinidade) de bactérias para produção de biossurfactantes, bem como purificar e caracterizar o biossurfactantes dos isolados mais promissores.

## REFERÊNCIAS

- APARNA, A.; SRINIKETHANA, G.; SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. *Colloids Surf., B.*, v. 95, p. 23-29, 2012.
- ARAÚJO, R.O. **Produção de biossurfactantes e potencial de degradação do óleo diesel por bactérias isoladas de ambientes contaminados por petróleo.** 2017. p. 29. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.
- BUNPA, S.; SERMWITTAYAWONG, N.; VUDDHAKUL, V. Extracellular Enzymes Produced by *Vibrio alginolyticus* Isolated from Environments and Diseased Aquatic Animals. *Procedia Chemistry*, v. 8, p. 12-17, 2016.
- CARVALHO, L.C.T. **Produção de lipases e biossurfactantes por bactérias isoladas de um solo contaminado por óleo vegetal residual.** 2012. p. 35. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.
- COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; LEPINE, F.; DEZIEL, E.; CONTIERO, J. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. *Process Biochem.*, v. 45, p. 1511-1516, 2010.
- GAYLARDE, C. Seleção de microrganismos produtores de surfactantes e avaliação da base fisiológica da produção. In: SILVA, C.M.M.S.; ROQUE, M.R.; MELO, I. S. (Eds.). **Microbiologia ambiental: Manual de Laboratório.** Jaquariuna: Embrapa Meio Ambiente, 2000.
- GUDINÃ, E. J.; RANGARAJAN, V.; SEN, R.; RODRIGUES, L. R. Potential therapeutic applications of biosurfactants. *Pharmacological Sciences*, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.10.002>
- GRAZIANO, M.; RIZZO, C.; MICHAUD, L.; PORPORATO, E.M.D.; DOMENICO, E.; SPANÒ, N.; GIUDICE, A.L. Biosurfactant production by hydrocarbon-degrading *Brevibacterium* and *Vibrio* isolates from the sea pen *Pteroeides spinosum* (Ellis, 1764). *Jornal of Basic Microbiology*, 2016.
- HOU X. M.; XU R. F.; GU Y. C.; WANG, C. Y.; SHAO, C. L. Biological and chemical diversity of coral-derived microorganisms. *Curr Med Chem.*, 22 (32):3707-62, 2015.
- HU, X.; WANG, C.; WANG, P. Optimization and characterization of biosurfactant production from marine *Vibrio* sp. strain 3B-2. *Frontiers in Microbiology*. 2015.

JACKSON, S.A.; BORCHERT, E.; O'GARA, F.; DOBSON, ADW. Metagenomics for the discovery of novel biosurfactants of environmental interest from marine ecosystems. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 33, p. 176-182, 2015.

JEMIL, N.; AYED, H.B.; HMIDET, N.; NASRI, M. Characterization and properties of biosurfactants produced by a newly isolated strain *Bacillus methylotrophicus* DCS1 and their applications in enhancing solubility of hydrocarbon. **World Journal Microbiology Biotechnology**, 2016.

LANE A.L.; KUBANEK J. Secondary metabolite defenses against pathogens and biofoulers. In: AMSLER, C.H. (Ed.). **Algal chemical ecology**. Berlin: Springer, 2008. p. 229-243.

LEITE, G. G. F.; FIGUEIRÔA, J. V.; ALMEIDA, T. C. M.; VALÕES, J. L.; MARQUES, W. F.; DUARTE, M. D. D. C.; GORLACH-LIRA, K. Production of rhamnolipids and diesel oil degradation by bacteria isolated from soil contaminated by petroleum. **Biotechnology Progress**, 2015. <https://dx.doi.org/10.1002/btpr.2208>

MAGALHÃES, L. **Avaliação da atividade antimicrobiana de rhamnolipídeos sobre *Listeria monocytogenes***. 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica) – Universidade De São Paulo – USP, São Carlos, 2012.

MARHAVER, K.L.; EDWARDS, RA.; ROHWER, F. Viral communities associated with healthy and bleaching corals. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 2277-2286, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01652.x>

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

PACWA-PLOCINICZAK, M.; PŁAZA, G.A.; POLIWODA, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, 2014.

PHAM, T.M.; WIESE.; WENZEL-STORJOHANN.; IMHOFF, J. Diversity and antimicrobial potential of bacterial isolates associated with the soft coral *Alcyonium digitatum* from the Baltic Sea. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 109, p. 105-119, 2016. <https://dx.doi.org/10.1007/s10482-015-0613-1>

ROHWER, F.; KELLEY, S. Culture-independent analyses of coral-associated microbes. In: ROSENBERG, E.; LOYA, Y. (Ed.). **Coral health and disease**. Berlin: Springer, 2004. p. 265-278.

SILVA, R.M.S. Diversidade de bactérias cultiváveis associadas às colônias sadias e necrosadas do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* dos recifes costeiros de Carapibus, Paraíba. 2015. p. 56. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnol Adv.**, v. 24, p. 604-620, 2006.

VARJANI, S.J.; UPASANI, V.N. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. **Bioresource Technology**, 2017.

YOUSSEF, N.H.; DUCAN, K.E.; NAGLE, D.P.; SAVAGER, K.N.; KNAPP, R.M.; MCINERNEY, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **J. Microbiol. Methods**, v. 56, 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 Biosyst Eng**. 2017.