

## **Isolamento e Seleção de Microrganismos Produtores de Biossurfactantes Provenientes de Solo e Turfa Contaminados com Petróleo**

**Beatriz Caetano Benuto<sup>1</sup>, Dayt Lhuana Martins Corsino<sup>1</sup>,  
Gabriela Borges Florentino<sup>1</sup>, Maria Inês Rezende<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina-CCE, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia  
Caixa Postal 10.011-CEP 86057-970, Londrina-PR, E-mail: [beatrizcbenuto@gmail.com](mailto:beatrizcbenuto@gmail.com)

### **RESUMO**

Os biossurfactantes têm sido alvo de muitos estudos atualmente, sobretudo por suas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos. Entre as vantagens estão a biodegradabilidade, baixa toxicidade e capacidade de reduzir a tensão superficial. Dessa forma podem ser aplicadas em vários setores industriais, tais como: alimentar, farmacêutico, cosméticos e petrolífero. Sendo assim, objetivou-se selecionar microrganismos com potencial para produção biossurfactantes. Neste estudo foram isolados 250 microrganismos sendo 115 bactérias, 67 leveduras e 68 fungos filamentosos. Os melhores resultados para o índice de emulsificação foram 57 % alcançado para uma Gram positiva e 81 % para uma cepa de fungo filamentoso. Estes resultados contribuem com a seleção de novas cepas potenciais para a produção de biossuractantes .

**Palavras-chave:** Biossurfactantes; Turfa; Solo; Índice de Emulsificação; Petróleo.

### **INTRODUÇÃO**

O grupo de compostos conhecidos como surfactantes compreende moléculas anfipáticas, ou seja, com porções hidrofílicas e hidrofóbicas, que possuem a característica de reduzir a tensão superficial, que é a força existente entre uma superfície ar-líquido e a tensão interfacial, força existente entre uma superfície líquido-líquido<sup>1</sup>. Os indicadores mais utilizados para medir a atividade surfactante são os parâmetros tensão superficial, tensão interfacial e a concentração micelar crítica (CMC).

Os surfactantes disponíveis comercialmente são sintetizados a partir de derivados de petróleo. O aumento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente vêm pressionando indústrias a produzir surfactantes menos tóxicos, levando à procura por surfactantes naturais biodegradáveis como alternativas aos produtos existentes<sup>3</sup>. São caracterizados por suas propriedades emulsificantes, que são determinadas pelos parâmetros índice de emulsificação, estabilidade de emulsão e também pela atividade de emulsificação<sup>3</sup>.

Atualmente a produção em larga escala ainda não é vantajosa economicamente quando comparada aos equivalentes sintéticos, devido ao custo de produção, relacionada à alta especificidade dos processos fermentativos que devem ser otimizados de acordo com cada

microrganismo produtor, como também, técnicas pouco eficientes de extração/purificação<sup>4</sup>. Sendo assim a descoberta de novos microrganismos produtores, irá colaborar com o estudo do processo produtivo dos surfactantes de origem microbiana.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

**1-ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS:** Os materiais utilizados para o isolamento das bactérias, leveduras e fungos filamentosos foram sete amostras de solo e turfa contaminados com petróleo e provenientes das proximidades da Refinaria Getúlio Vargas (REPAR-PR). Para cada amostra foi pesado 1 g de material que foi então submetido à diluições seriadas (até  $1 \times 10^5$ ) em salina fisiológica estéril cada uma das amostras diluídas foram semeadas alça de Drygalski em placas de Petri contendo diferentes e incubadas a  $28 \pm 2$  °C por no mínimo 48 e no máximo 96 horas.

**2-MEIOS DE CULTIVO:** Os meios de cultivo utilizados para o isolamento foram batata dextrose ágar (BDA) para isolamento de fungos filamentosos, extrato de levedura dextrose, peptona e ágar (YEPD) para isolamento de leveduras e meio de Dyg's para isolamento de bactérias. Nos meios BDA e YEPD foi adicionado amoxicilina, na concentração de 2 mg/mL, para impedir o crescimento das bactérias.

**3-MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS:** Os isolados foram mantidos em tubos de ensaio contendo meio sólido inclinado de BDA, YEPD e ou Dyg's sob refrigeração a  $4 \pm 2$  °C com repiques trimestrais. Para a manutenção os BDA e YEPD foram utilizados sem a adição de antibiótico.

**4-CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA A FERMENTAÇÃO SUBMERSA:** As bactérias foram transferidas assepticamente com o auxílio de alça de platina do meio de manutenção para Erlenmeyers de 50 mL, contendo separadamente 9 mL de solução de sais constituída de 3,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 7,0 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 1,0 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  por litro<sup>5</sup>, adicionada de 1 mL de solução de glucose 2 % (m/v) como fonte de carbono. Os frascos foram incubados por 48 horas a  $28 \pm 2$  °C e 180 rpm.

**5-INTERRUPÇÃO DOS CULTIVOS E OBTENÇÃO DO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS (ELC):** Após interrupção dos cultivos, transferiu-se o conteúdo de cada frasco para tubos submetidos à centrifugação a  $9000 \times g$  a  $4 \pm 2$  °C. Os respectivos sobrenadantes foram coletados e armazenados como amostras para as determinações analíticas, como pH e índice de emulsificação.

**6-DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO:** A presença de biossurfactantes no ELC foi determinada indiretamente a partir da metodologia descrita por Chen, Baker e Darton (2007) com algumas modificações. Para determinação do índice foram utilizados 3 mL de ELC e 3 mL de querosene em tubos de rosca, homogeneizado em vórtex por 2 minutos. A leitura foi realizada através das medidas da altura da emulsão formada após 24 horas, e foi calculado pela equação: Índice da Emulsão (%) =  $\text{He} \times 100 / \text{Ht}$ , onde He = altura da emulsão; Ht = altura total do líquido<sup>6</sup>.

**7- COLORAÇÃO DE GRAM:** As bactérias que indicaram produção de biossurfactantes foram submetidas à coloração de Gram.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O processo de isolamento dos microrganismos foi desenvolvido durante sete meses, neste período foram obtidos 250 isolados. Durante este período, um processo de seleção exaustivo e criterioso foi desenvolvido para a obtenção de puras. A Tabela 1 apresenta o número de isolados obtidos a partir das diferentes amostras de solo e turfa.

**Tabela 1.** Número de isolados, fungos filamentosos, bactérias e leveduras, obtidos de cada amostra de solo ou turfa utilizadas

<b>Amostras</b>	<b>(A)</b>	<b>(B)</b>	<b>(C)</b>	<b>(D)</b>	<b>(E)</b>	<b>(F)</b>	<b>(G)</b>	<b>TOTAL</b>
<b>BDA</b>	31	10	33	04	02	12	23	115
<b>DYG'S</b>	11	08	18	0	0	06	24	67
<b>YEPD</b>	08	09	24	0	0	09	18	68

Amostras: (A): Solo A REPAR SUB 7-COLETA TURFA SOLO E; (B): Solo C: SUBÁREA 7-PONTO E-TURFA-COLETA 01; (C): Solo E: REPAR SUB 7 COL TURFA BURACO E; (D): Solo F: SOLO SUB 8 N-2; (E) Solo G: SOLO SUB 7 E; (F): Solo H: SUBÁREA 7 PONTO E- COLETA 01 SOLO; (G) Solo D: REPAR SUB 8. COL SOLO N-TURFA.

Foi possível diferenciar 115 isolados de fungos filamentosos, 67 isolados de bactérias e 68 isolados de leveduras. Para a maioria dos solos (A, B, C, F e G) foi possível recuperar todas as classes de microrganismos (fungos, leveduras e bactérias). Nos solos D e E só foi possível o isolar fungos filamentosos, e o número de isolados foi bastante restrito, 04 para o solo (D) e 02 para o solo (E).

Dos 250 isolados 90 bactérias e 54 fungos filamentosos foram submetidos ao cultivo em meio líquido e avaliados quanto a presença indireta de biossurfactantes pela determinação do índice de emulsificação ( $IE_{24}$ ) na presença de querosene. A Tabela 2 apresenta os resultados referentes aos isolados bacterianos, quando foram determinados além do índice de emulsificação, pH final, crescimento e a classificação quanto a coloração de Gram.

**Tabela 2.** Condição de produção de biossurfactantes pelas cepas de bactérias selecionadas

<b>ISOLADO</b>	<b>SOLO</b>	<b>MEIO DE CULTURA</b>	<b>pH</b>	<b>[CRESCIMENTO]</b>	<b><math>IE_{24}</math></b>	<b>COLORAÇÃO DE GRAM</b>
<b>72</b>	C	DYG'S	6.8	+	57	Gram (-)
<b>147</b>	E	BDA	6.8	++	57	Gram (-)
<b>158</b>	H	DYG'S	6.8	++++	51	Gram (-)
<b>223</b>	D	DYG'S	6.7	++	54	Gram (+)

Onde: (+) mínimo (++) bom (+++) ótimo (++++) excelente

A melhor produção de biossurfactantes foi em pH 6,7 e 6,8, entre as três cepas Gram negativas, 72, 174 e 158, e uma positiva, a 223, após 48 h de fermentação.

A Tabela 3 apresenta os resultados referentes à avaliação dos fungos filamentosos, para esses isolados foram determinados o índice de emulsificação e a biomassa. Foram obtidos os maiores  $IE_{24}$  para a cepa 268 com 81 % e 0,0950 g de biomassa e a cepa 275 com 71 % e 0,0991 g de biomassa. Estes resultados contribuem com a seleção de novas cepas que serão futuramente estudadas como produtoras de biossurfactantes.

**Tabela 3.** Condição de produção de biossurfactantes pelas cepas de bactérias selecionadas

<b>ISOLADOS</b>	<b>BIOMASSA (g)</b>	<b>ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO (IE<sub>24</sub>)</b>
<b>116</b>	0,0297	68
<b>119</b>	0,0633	67
<b>142</b>	0,0132	57
<b>151</b>	0,0767	52
<b>152</b>	0,0324	51
<b>220</b>	0,0570	50
<b>268</b>	0,0950	81
<b>272</b>	0,0387	62
<b>275</b>	0,0991	71
<b>282</b>	0,0971	50

### CONCLUSÕES

- Foi possível confirmar a grande diversidade microbiana cultivável presente nas amostras de solo e turfa;
- A maioria das amostras de solo e turfa utilizadas apresentou a seguinte ordem decrescente de isolados fungos filamentosos > leveduras > bactérias;
- Os melhores índices de emulsificação foram obtidos para as bactérias (Isolados 72 e 147) Gram negativas de 57 % e para os fungos filamentosos (Isolado 268) de 81 %.

### REFERÊNCIAS

- (1) BODOUR, A.A.; MILLER-MAIER, R.M. **Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantification and screening of biosurfactant producing microorganisms.** Journal of Microbiological Methods, v.32, p.273-280, 1998.
- (2) CHRISTOFI, N.; IVSHNA, I.B. **Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation.** Journal of Applied Microbiology, v.93, p.915-929, 2002.
- (3) DELEU, M.; PAQUOT, M. **From renewable vegetable resources to microorganisms: new trends in surfactants.** Computers Rendus Chimie, v.7, p.641-646, 2004.
- (4) KRIEGER, N.; CAMILIOS NETO, D.; MITCHELL, D.A. **Production of microbial biosurfactants by solid-state cultivation.** In: Ramkrishna Sen. (Org.). Advances in Experimental Medicine and Biology. Biosurfactants. New York: Springer Science+Business media, LCC< Landes Bioscience, v.672, p.203-209, 2010.
- (5) COSTA, S.G.V.A. **Estudo da produção de metabólitos por pseudomonas aeruginosa: ramnolipídeos e polihidroxicanoatos (phas).** Tese (doutorado) Universidade Estadual Paulista-Instituto de Biociências de Rio Claro, 2010.
- (6) CAMILIOS NETO, D. **Produção de ramnolipídios por fermentação em estado sólido.** 2010 156p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná
- (7) CHEN, C-Y.; BAKER, S.C.; DARTON, R.C. **The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources.** Journal of Microbiological Methods, v.70, p.503-510, 2007.