

## OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR BACTÉRIAS ISOLADAS DA LAGOA DE PRAIA DO FLAMENGO, SALVADOR-BA.

Eduardo Gomes Vieira de Melo e Jemile Aguiar de Figueiredo Bahiana<sup>1</sup>  
Tâmara São Paulo Vidal<sup>2</sup>  
Juan Carlos Rossi Alva<sup>3</sup>  
Luzimar Gonzaga Fernandez<sup>4</sup>

**Resumo:** Este trabalho teve como objetivo otimizar os parâmetros de produção de biossurfactantes por bactérias isoladas na Lagoa de Praia do Flamengo – Bahia. Foram selecionados 5 isolados cedidos pelo Laboratório de Estudos em Meio Ambiente (LEMA/UCSal), sendo feita inicialmente reativação dos mesmos em meio YPDA, semeadura e incubação em estufa a 30° C por 24 horas. Para analisar a produção de biossurfactante, foi preparado um meio salino de produção (MSP) contendo glicerol como fonte de carbono, sendo inoculados em erlenmeyers e incubados em shaker a 25°C, 180 rpm por 7 dias, de onde foram retiradas alíquotas diárias para análise quantitativa e semi-quantitativa. Para essa análise foram realizados o método E<sub>24</sub> (Ensaio de emulsificação) e o método Colorimétrico Fenol / Ácido Sulfúrico, sendo este último desenvolvido para a dosagem de glicolipídios, onde a 1 mL do sobrenadante foi adicionado 1 mL de fenol 5% e 5mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, sendo posteriormente feita a leitura no espectrofotômetro. Desta forma, foram avaliados quantitativamente em diversos valores de pH inicial do meio, assim como 5 concentrações de glicerol. Os resultados mostraram que ajustando o pH em 8,0 há uma melhora no processo de produção de biossurfactantes pelas 5 bactérias analisadas e a variação diária da produção de biossurfactantes nos isolados entre o 4° e 6° dia foi maior que a variação entre o 6° e 8° dia para a maioria dos isolados, sendo suficiente o cultivo destes isolados apenas até o 6.º dia, diminuindo assim os custos na produção.

**Palavras-chave:** Biossurfactantes; Microrganismos; Biorremediação

### 1. INTRODUÇÃO

A poluição ambiental por derivados de petróleo, óleos e graxas é um problema de escala mundial e, a cada ano, a quantidade de resíduos oleosos emitidos por indústrias de diversos ramos aumenta bruscamente. O interesse industrial na biotecnologia e o reconhecimento de sua importância por todos os países industrializados do mundo possibilitam modificações no tratamento de efluentes e tornam emergente a necessidade de novas tecnologias. Sendo assim, o maior estímulo para o estudo do crescimento de microrganismos na presença de hidrocarbonetos consiste na possível utilização destes organismos no tratamento da poluição do meio ambiente por compostos oleosos. Bactérias, leveduras e fungos filamentosos que degradam substratos insolúveis em água como os hidrocarbonetos sólidos e líquidos, gorduras, óleos e graxas,

<sup>1</sup> Estudantes do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Católica do Salvador – UCSal e estagiários do Laboratório de Estudos em Meio Ambiente – LEMA/UCSal. E-mail: [edu\\_vieira81@yahoo.com.br](mailto:edu_vieira81@yahoo.com.br); [milebahiana@yahoo.com.br](mailto:milebahiana@yahoo.com.br).

<sup>2</sup> Bióloga pela Universidade Católica do Salvador – UCSal. Laboratório de Estudos em Meio Ambiente – LEMA/UCSal. E-mail: [tamarapv@ucsal.br](mailto:tamarapv@ucsal.br).

<sup>3</sup> Doutor, Professor da Universidade Católica do Salvador – UCSal, Pesquisador do Laboratório de Estudos em Meio Ambiente – LEMA/UCSal. E-mail: [jcrossi@ucsal.br](mailto:jcrossi@ucsal.br). – ORIENTADOR.

<sup>4</sup> Doutora, Professora da Universidade Católica do Salvador – UCSal, Coordenadora do Laboratório de Estudos em Meio Ambiente – LEMA/UCSal. Professora do Departamento de Biofunção do Instituto de Ciências da Saúde (ICS/UFBA). E-mail: [lema@ucsal.br](mailto:lema@ucsal.br). – CO-ORIENTADORA.

usualmente produzem biossurfactantes que auxiliam na disponibilidade destes compostos à célula microbiana através das emulsões formadas (CARVALHO *et al.*, 2005).

Os Surfactantes são formados por moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. A porção apolar é freqüentemente uma cadeia hidrocarbonada, enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica (NITSCHKE & PASTORE, 2002). Os biossurfactantes estruturalmente apresentam combinações diversas, principalmente aqueles produzidos por microrganismos na presença de hidrocarboneto, sendo classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana (LANG & WULLBRANDT, 1999; DYKE *et al.*, 1991).

Segundo Karanth e colaboradores (1999), os surfactantes microbianos de baixo peso molecular são freqüentemente glicolipídicos, os de alto peso molecular são heteropolissacarídeos polianiônicos ou complexos glicoproteicos. O rendimento do surfactante microbiano varia de acordo com o substrato utilizado para a produção do crescimento microbiano e da linhagem utilizada.

Os surfactantes sintéticos apresentam características que proporcionaram avanços nos mais diversos ramos da indústria, contudo a utilização de surfactantes biológicos apresenta vantagens por serem menos tóxicos, menos alergênicos, biodegradáveis, o que implica menor impacto biológico (TURKOVSKAYA *et al.*, 1999).

Segundo Bognolo (1999), os surfactantes naturais apresentam vantagens em relação aos sintéticos: atividade de superfície e interface, os biossurfactantes são bastante eficientes quando comparados, por exemplo, a sulfonatos aniônicos, haja vista que tem a capacidade de reduzir a tensão superficial mais rapidamente; a concentração micelar crítica (CMC) dos biossurfactantes (medida de sua eficiência) varia entre 1-2000mg/L, enquanto que a tensão interfacial (óleo/água) superficial fica em torno de 1 e 30 mN/m respectivamente (NITSCHKE & PASTORE, 2002). Alguns biossurfactantes não são afetados mesmo a temperaturas elevadas, não precipitam em soluções salinas de até 10%, enquanto que soluções de 2-3% de sal são suficientes para incapacitar os surfactantes de origem química; os biossurfactantes são com facilidade degradados tanto em água como em solo e o seu potencial de aplicação é baseado nas propriedades de emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Essas propriedades fornecem potencial de aplicação nas indústrias de alimentos, agrícola, construção, bebidas, papel, metal, têxtil, farmacêutica, cosmética (NITSCHKE & PASTORE, 2002; MULLIGAN *et al.*, 2001; BOGNOLO, 1999; FIECHTER, 1992 apud CASTIGLIONI 2006, p. 25).

Um dos usos para os biossurfactantes que tem recebido constante atenção é conhecido por MEOR (Microbial-Enhanced Oil Recovery), cujo processo envolve a introdução de microrganismos em reservatórios de óleo cru para melhorar a extração da borra oleosa e recuperar frações de hidrocarbonetos. Este método também está sendo proposto e testado em algumas partes do mundo, para combater a poluição ambiental gerada por derramamentos acidentais de óleo. O principal uso comercial dos biossurfactantes está na remediação, por causa de sua capacidade em estabilizar emulsões. Isto faz com que ocorra um aumento na solubilidade e na disponibilidade de contaminantes hidrofóbicos, aumentando o potencial para biodegradação.

Este trabalho tem como objetivo otimizar os parâmetros de produção de biossurfactantes por bactérias isoladas da Lagoa de Praia do Flamengo – Bahia.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

As bactérias **BTS1-01**, **BTS2-02**, **BTS4-03**, **BTS4-04** e **BTS4-08**, obtidas do banco de microrganismos do LEMA, foram isoladas a partir de amostras de sedimento da Lagoa de Praia do Flamengo, localizada no bairro de Praia do Flamengo, Salvador, Bahia.

Os meios de cultura utilizados foram preparados seguindo protocolo padrão, os meios sólidos após a autoclavagem foram vertidos em placas de Petri, e incubados na estufa a 37°C por 24hs para o teste de esterilização, para verificar ou não a presença de contaminações dos meios (MARRAY *et al.*, 2002). O meio YPDA foi utilizado para a manutenção e purificação de microorganismos. O meio MSP foi utilizado para produção de biossurfactantes contendo glicerol como fonte de carbono.

Com auxílio da alça de platina, foi feita semeadura dos isolados em meio YPDA, sendo em seguida incubados em estufa a 30° C por 24 horas. Após a análise de todas as colônias, foram feitas identificações morfológicas e posterior confirmação da integridade e da pureza dos isolados pela coloração de Gram e provas bioquímicas (OPLUSTIL, 2004).

Os isolados BTS1-01, BTS2-02, BTS4-03, BTS4-04 e BTS4-08, foram inoculados em erlenmeyers contendo meio MSP (30g de glicerol por litro) e incubados em shaker a 25°C e 180 rpm por 7 dias, de onde foram retiradas alíquotas diariamente para análises. Em seguida foram realizados testes variando em 0,5 a faixa de pH do meio de cultura MSP, que ficou compreendida entre 6,5 a 8,5. O pH foi aferido utilizando pHmetro de bancada marca WTW modelo Inolab e ajustado para a faixa desejada com soluções de HCl e KOH 1N. Foram preparados também meios MSP com concentração de glicerol variando em 10, 20, 30, 40 e 50 gramas por litro (g/L), mantendo a concentração dos demais componentes segundo a formulação inicial.

Testou-se óleo de soja como substrato alternativo ao glicerol, com concentrações estipuladas em 10, 20, 40 e 50 g/L no meio de cultura MSP. Nestes foram inoculados os isolados BTS1-01, BTS2-02, BTS4-03, BTS4-04 e BTS4-08, com pH 8,0, sendo incubados em shaker a 25°C e 180 rpm por 7 dias, de onde foram retiradas alíquotas diariamente para análises.

A atividade emulsificante foi medida usando o método descrito por Cooper e colaboradores 1998, onde 2mL do caldo livre de células e 2mL de óleo mineral foram transferidos para tubos de ensaio. Em seguida, a mistura foi agitada em agitador de tubos tipo vórtex durante 2 minutos e deixada em repouso por 24 horas. A produção de biossurfactantes foi medida através do índice de emulsificação ( $E_{24}$ ), que consiste no quociente da altura da camada emulsificada (mm) pela altura total da coluna líquida (mm). O controle negativo foi realizado com 2mL do meio não inoculado e o controle positivo com 2mL de SDS. Os resultados foram expressos em porcentagem.

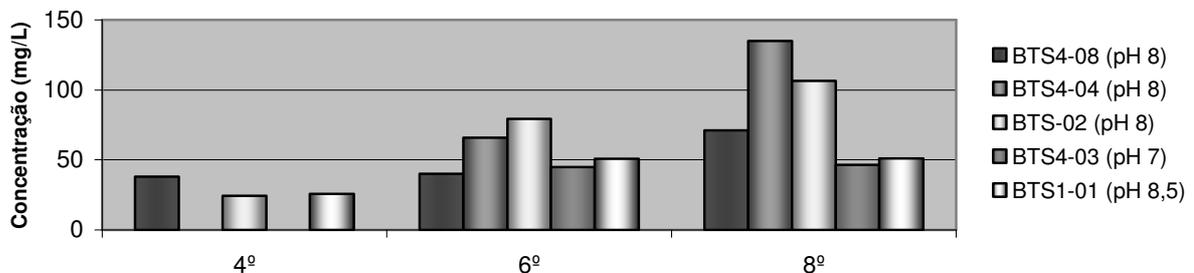
Foi testado também o método colorimétrico fenol/ ácido sulfúrico, desenvolvido por Dubois e Colaboradores em 1956, para a dosagem de glicolípídios. Foram retiradas diariamente alíquotas de 1,4mL de cada isolado cultivado nos diferentes tratamentos. Estas foram centrifugadas a 60 rpm por 15 minutos, sendo posteriormente retirado 1mL do sobrenadante que foi diluído 5 vezes. Adicionou-se em tubos de vidro, 1mL de fenol 5% (p/v), 5mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado e 500µL do sobrenadante diluído. Após homogeneização em agitador de tubos tipo vortex, esta solução foi lida em espectrofotômetro (Merk, modelo Spectroquant Nova-60 e Varian, modelo Carry 50) no comprimento de onda de 500nm). Como controle negativo (branco), foi utilizado meio de cultura MSP não inoculado. Para a determinação da concentração dos ramnolípideos foi produzida uma curva padrão utilizando concentrações conhecidas de ramnose. As densidades óticas obtidas das amostras foram submetidas à equação da curva padrão para conversão dos valores em concentração. Estes valores foram expressos em mg/L

Para a análise estatística dos dados foi usada a média aritmética para obter o grau de dispersão dos valores em relação ao valor da produção de biossurfactante (BEIGUELMAN, 2002).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foi analisada a produção de biossurfactantes por 5 isolados bacterianos em pH 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 e 8,5.

Entre os isolados estudados neste trabalho, o BTS1-01 teve a maior produção de biossurfactante na faixa de pH 8,5 (51,2 mg/L); o BTS4-03 apresentou a sua melhor produção de biossurfactante no pH 7,0 (46,4 mg/L). Os isolados BTS2-02; BTS4-04 e BTS4-08 produziram maior quantidade de biossurfactante em pH 8,0 (106,5; 134,9 e 71,1 mg/L respectivamente). Ao analisar a quantidade total de biossurfactantes produzida por cada isolado, o melhor desempenho foi do BTS4-04 com uma produção de 134,9 mg/L em pH 8,0 (Gráficos 01 e 02).



**Gráfico 01** – Média da produção de biossurfactantes de todos os isolados (BTS1-01, BTS2-02, BTS4-03, BTS4-04 e BTS4-08) em seu pH ótimo durante os dias analisados.

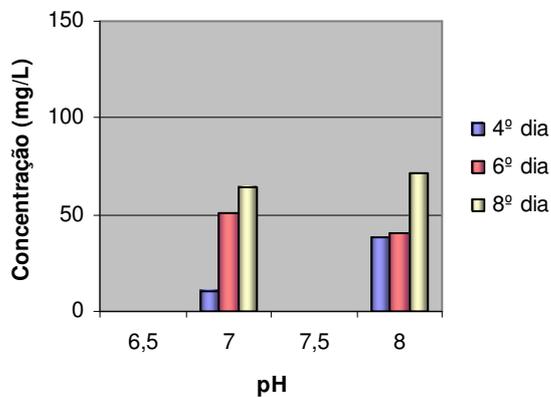
Ao analisar a variação diária da produção de biossurfactantes nos isolados ( $\Delta$ ) detecta-se que a variação entre o 4º e 6º dia ( $\Delta$ d 4-6) é maior que a variação entre o 6º e 8º dia ( $\Delta$ d 6-8), excetuando BTS2-02 pH 7,5, BTS4-04 pH 7,5 e BTS4-08 pH 8,0 (Tabela 1). Infere-se que esta produção atinge o seu máximo durante a fase LOG da vida bacteriana, decaindo com o esgotamento do substrato.

**Tabela 01** – Média da variação da produção diária de biossurfactantes pelos isolados (BTS1-01, BTS2-02, BTS4-03, BTS4-04 e BTS4-08) para o teste de variação de pH. Os dados estão expressos em mg/L.

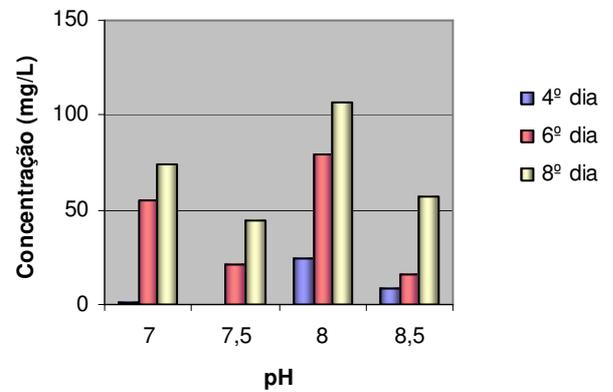
ISOLADOS	$\Delta d$ 4-6	$\Delta d$ 6-8
<b>BTS1-01 (pH 7,5)</b>	3,75	0,32
<b>BTS1-01 (pH 8)</b>	15,90	0,32
<b>BTS1-01 (pH 8,5)</b>	25,31	0,32
<b>BTS2-02 (pH 7)</b>	54,01	18,89
<b>BTS2-02 (pH 7,5)</b>	21,04	23,72
<b>BTS-02 (pH 8)</b>	55,02	27,22
<b>BTS2-02 (pH 8,5)</b>	7,00	41,71
<b>BTS4-03 (pH 6,0)</b>	0,97	2,34
<b>BTS4-03 (pH 7)</b>	45,05	1,37
<b>BTS4-04 (pH 7)</b>	99,34	24,50
<b>BTS4-04 (pH 7,5)</b>	3,88	22,52
<b>BTS4-04 (pH 8)</b>	65,79	69,10
<b>BTS4-04 (pH 8,5)</b>	36,81	0,00
<b>BTS4-08 (pH 7)</b>	40,97	13,28
<b>BTS4-08 (pH 8)</b>	2,14	30,92

\* Os isolados que tiveram produção igual a zero em todos os dias analisados foram excluídos

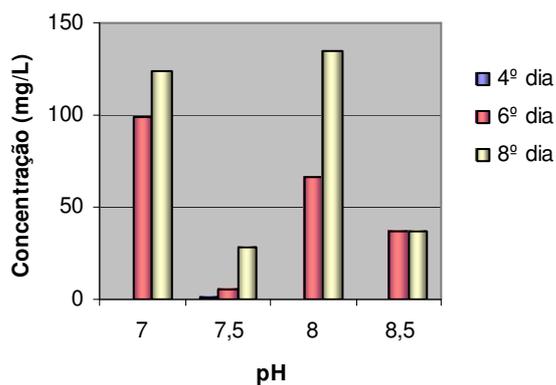
**Produção de Biosurfactantes pelo isolado BTS4-08**



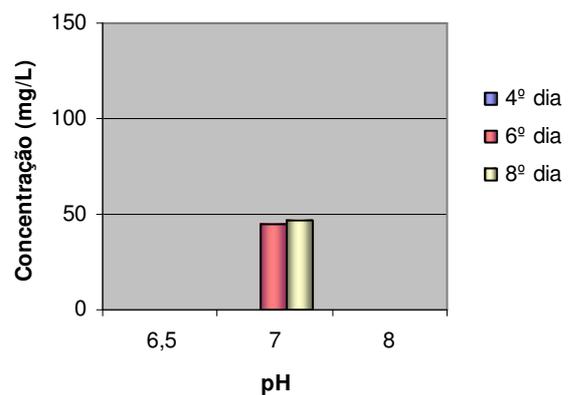
**Produção de Biosurfactantes pelo isolado BTS2-02**



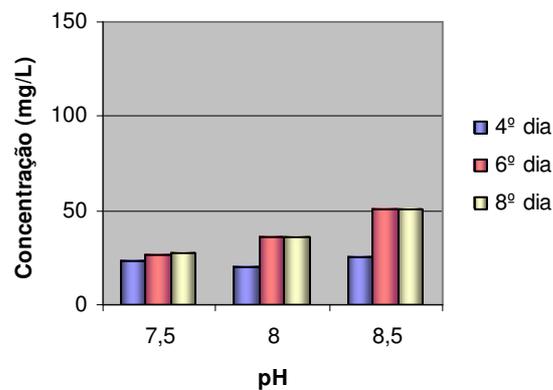
**Produção de Biosurfactantes pelo isolado BTS4-04**



**Produção de Biosurfactantes pelo isolado BTS4-03**



**Produção de Biosurfactantes pelo isolado BTS1-01**



**Gráfico 02** – Média da produção de biosurfactantes pelos isolados (BTS1-01, BTS2-02, BTS4-03, BTS4-04 e BTS4-08) inoculados em meios de cultura de diferentes pH

A variação diária da produção de biossurfactantes nos isolados ( $\Delta d$ ) entre o 4° e 6° dia ( $\Delta d$  4-6) é maior que a variação entre o 6° e 8° dia ( $\Delta d$  6-8), excetuando BTS1-01 a 40 g/L e BTS4-03 a 50g/L (Tabela 2).

Excetuando BTS4-03, houve produção de biossurfactantes com todos os isolados inoculados nos meios de cultura contendo 10mg/L de glicerol como fonte de carbono, sendo o que apresentou melhor desempenho foi o BTS2-02 com 36,8 mg/L. No meio contendo 20 30 e 50mg/L de glicerol, BTS4-04 apresentou o melhor desempenho (160,3 138,8 e 190,8 mg/L) respectivamente. Para a concentração de 40 mg/L, o isolado BTS4-03 obteve melhor rendimento para produção de biossurfactante (200,3mg/L). O isolado que apresentou melhor desempenho no teste de variação da concentração de glicerol foi o BTS4-03 inoculado em meio contendo 40g/L de glicerol (200,3 mg/L).

**Tabela 02** - Média da variação da produção diária de biossurfactantes pelos isolados (BTS1-01, BTS2-02, BTS4-03, BTS4-04 e BTS4-08) para o teste de variação da concentração de glicerol. Os dados estão expressos em mg/L.

	$\Delta d$ 4-6	$\Delta d$ 6-8
<b>BTS1-01 40 g</b>	8,565	19,313
<b>BTS1-01 50 g</b>	30,301	2,099
<b>BTS2-02 40g</b>	103,868	49,158
<b>BTS2-02 50g</b>	114,560	2,099
<b>BTS4-03 40g</b>	148,285	1,776
<b>BTS4-03 50g</b>	42,211	56,247
<b>BTS4-04 40g</b>	143,699	0
<b>BTS4-04 50g</b>	133,732	0,323
<b>BTS4-08 40g</b>	139,017	1,776
<b>BTS4-08 50g</b>	130,287	0,484

\* Os isolados que tiveram produção igual a zero em todos os dias analisados foram excluídos

Os resultados do teste  $E_{24}$  obtidos com a utilização do substrato alternativo, óleo de soja, foram todos negativos, sendo necessários novos testes utilizando óleo de soja puro, pois aqueles comercializados nas lojas contêm conservantes e antioxidantes que interferem na produção de biossurfactantes.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maioria dos isolados teve a melhor performance para produção de biossurfactantes em pH 8,0; excetuando BTS1-01 e BTS4-03, que obtiveram produção máxima em pH 8,5 e 7,0 respectivamente.

Ao variar o pH, o isolado com maior desempenho de produção foi o BTS4-04 em pH 8,0. Este também apresentou melhor desempenho ao variar a concentração de glicerol em 20 g/L 30 e 50mg/L no meio de cultura.

O isolado com melhor produção em meio contendo 10 g/L e 40 g/L foi BTS2-02 e BTS4-03 respectivamente, sendo a maior produção em 40 g/L. BTS4-03 apresentou os teores de biossurfactantes mais elevados entre os selecionados para este trabalho nas condições descritas anteriormente, portanto poder-se-ia apontá-lo como o mais indicado para uso em biorremediação.

A variação diária da produção de biossurfactantes nos isolados entre o 4º e 6º dia foi maior que a variação entre o 6º e 8º dia para a maioria dos isolados, sendo suficiente o cultivo destes isolados apenas até o 6.º dia, diminuindo assim os custos na produção.

## 5. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Testar novos substratos: Óleo de mamona, girassol e canola para eventual análise de produção de biossurfactantes.
- Repetir teste com óleo de soja puro não comercializado.
- Realizar testes de avaliação do consumo de substrato

## REFERÊNCIAS

BOGNOLO, G, **Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons**, Elsevier Science Ltda,1998.

CARVALHO, D. F., Marchi, D. D. e Durrant, L. R. (1997) XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos – SP.

CASTIOGLIONI, Gabriel. L Modelagem e simulação da produção de biossurfactantes e lipase por fermentação em estado sólido. Rio Grande, RS, 2006. Dissertação-Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

DYKE, M.I.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Applications of Microbial Surfactants. **Biotechnology Advances**.v.9.p241-252 1991.

FIECHTERA .Biosurfactantes: moving Towards industrial application **Trends in Food Science an Technology**.v.31,p.283-293,1992.

Karant N. G. K., Deo P. G. and Veenanadig N. K. **Microbial production of biosurfactants and their importance**. Department of Biochemistry, Indian Institute of Science, Bangalore 560 012, India,1999.

LANGS,S.;WULLBRANT. Rhamnose lipids-biosynthesis,microbial production and applications potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**.v.51,p.22-32,1999.

MARRAY, P.R. et al. **Microbiologia Médica**. Espanha: Elsevier Science, 2002. 810p.

MARCHI, D. D.; CARVALHO, D.F, DURRANT, R.L; **Production of Bacterial Biosurfactants in Vegetable and Derived of Petroleum**,2002, DCA/FEA- UNICAMP Campinas –SP.

MULLIGAN, C.N.; YONG,R.N.;GIBBS,B.F.Surfactant enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**.v.60,p.371-380,2001.

NITSCHKE, Marcia; PASTORE , Maria Gláucia. **Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações**. *Quim. Nova*, Vol. 25, No. 5, 772-776, 2002.. Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, CP 6121,13083-970 Campinas – SP.

OPLUSTIL, C.P. et al. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. São Paulo: Sarvier, 2004. 298-299p.

TURKOVSKAYA, O.V.; DMITRIEVA, T.V.;MURATOVA,A.Y.A Biosurfactant-producing Pseudomonas aeruginosa Strain **Applied Biochemistry and Microbiology**.v.37,n.1,p.71-75,1999.