



V Seminário de Iniciação Científica

Talentos da Ciência e Tecnologia em ação

☰ Dias 26 e 27 de setembro de 2019

📍 Auditório e Pátio - Unidade II



PROSPECÇÃO DE SURFACTANTES BACTERIANOS

Dalila dos Santos Queiroz¹ – Unifesspa

e-mail: queiroz_dal456@outlook.com

Sidnei Cerqueira dos Santos² - Unifesspa

e-mail: sidnei.cerqueira@unifesspa.edu.br

Agência Financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Eixo Temático/Área de Conhecimento: Biotecnologia, Microbiologia e Interdisciplinar

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos apresentam grande diversidade genética e desempenham funções ecológicas importantes na manutenção de ecossistemas e da biosfera, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos. Essa diversidade genética é também refletida em uma diversidade metabólica (PEIXOTO, 2008). Nesse contexto, está em evidência os biossurfactantes, substâncias de origem microbiana que tem despertado interesse industrial, principalmente no que tange aos processos de recuperação ou biorremediação ambiental (SANTOS et al., 2018).

Problemas ambientais tem se tornado cada vez mais frequente e crítico, principalmente devido ao crescimento populacional e aumento de atividades industriais, refletindo em poluição ambiental. Os biossurfactantes têm demonstrado uma forma eficaz e natural de remediação de problemas advindos da ação antrópica, como a contaminação por agrotóxicos ou metais pesados. Os surfactantes microbianos possuem uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica, exibindo atividade tensoativa e emulsificante, podendo ser adicionados no meio ambiente para estimular o processo de biorremediação (DECESARO et al., 2013). Os biossurfactantes, quando comparado aos sintéticos, apresentam vantagem pela baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, variedade de estruturas químicas, estabilidade em condições extremas de pH, temperatura e salinidade (MACIEL, 2009).

Li (2002) enfatiza que é necessário levar em consideração as etapas de crescimento celular e o acúmulo de produtos metabólicos no processo de produção de biossurfactantes, que são fortemente influenciados pela composição do meio e dificulta a otimização de vários processos biotecnológicos. O solo apresenta-se como um importante nicho para a prospecção de microrganismos produtores de biossurfactantes (BUENO, 2008). Este trabalho objetivou isolar bactérias produtoras de surfactante (BPS), a partir de amostras ambientais, visando selecionar potenciais agentes biorremediadores de metais pesados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório Multiuso de Biologia da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (Unifesspa). As amostras de solo foram coletadas a partir de diferentes fontes naturais, como cavernas e áreas de mineração.

As amostras de solos provenientes de áreas com histórico de degradação ambiental (em processo de recuperação de minério, no estado do Pará), foram coletadas foram cultivadas em Erlenmeyer de 50 ml contendo 20 mL de dois diferentes Meio Salino Mineral (MSM), composição (g/L): 4,0g de K₂HPO₄; 1,5 de

¹Graduação em Superior de Tecnologia em Gestão Ambiental - Universidade do Norte do Paraná- UNOPAR. Graduanda do curso Ciências Biológicas, na Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Brasil - Campus III – Cidade Jardim, Marabá-PA.

²Graduação em Ciências Biológicas - Universidade Católica do Salvador- UCSal. Especialista em Microbiologia - Universidade Federal da Bahia- UFBA. Mestre em Biotecnologia - Universidade Estadual de Feira de Santana- UEFS. Doutor em Biotecnologia - Universidade Estadual do Ceará- UECE, Rede Nordeste de Biotecnologia- RENORBIO. Professor Adjunto da UNIFESSPA, Campus III, Marabá-PA.



V Seminário de Iniciação Científica

Talentos da Ciência e Tecnologia em ação

Dias 26 e 27 de setembro de 2019

Auditório e Pátio - Unidade II

UNIFESSPA | PROPIT

Na₂HPO₄; 1,0 de NaNO₃; 0,2 de MgSO₄.7H₂O; 0,02 de CaCl₂.2H₂O; 0,02 de FeCl₃.6H₂O; pH 7,0, suplementado com 1% de glicerol e 100 ppm dos metais cobre, zinco e chumbo; e outro suplementado com 1% de óleo diesel. As culturas foram incubadas no agitador orbital a 28°C, sob agitação de 140rpm, por 5 a 21 dias. Após estes procedimentos, foi realizado o isolamento bacteriano, através de sementes por esgotamento em placas de Petri contendo o meio Agar Tripton de Soja (TSA). Os isolados foram conservados em meio Hogness (BROCK et al., 2010).

As linhagens bacterianas previamente isoladas em solos da caverna Pedra da Cachoeira, na região Oeste de Pará, e os isolados de solos em processo de recuperação de minério foram inoculadas em MSM suplementado com 2% de glicerol como única fonte de carbono e energia. Os Erlenmeyer foram incubados em mesa agitadora à 28°C a 140 rpm, por até 5 dias. Após o período de incubação, o cultivo foi centrifugado a 4.000 rpm, por 20 minutos (28°C), visando a precipitação das células microbianas, e o sobrenadante foi utilizado no teste *drop-collapse* para seleção de bactérias produtoras de surfactante (YOUSSEF, et al., 2004). Para confirmar a produção de biosurfactante, foi realizado o ensaio de emulsificação, usando 2 mL do caldo livre de células (sobrenadante) e 2 mL de óleo mineral, transferidos para tubos de ensaio (LUNA et al., 2013). As misturas foram agitadas em vórtex e mantido em repouso por 24 horas. O crescimento microbiano associado a produção de biosurfactante foi realizado no espectrofotômetro, na densidade óptica (D.O.) de 600 nm. Os testes foram realizados em duplicata. Foram feitas identificações macro e microscópica dos microrganismos selecionados, cujas células microbianas foram caracterizadas morfológicamente por meio da coloração de Gram.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na prospecção das linhagens bacterianas CV13, CV34, CV30c, CV49 e CV16 de origem cavernícola, os resultados demonstraram que não houve produção de biosurfactantes por nenhuma destas cinco linhagens, visto que as gotas do sobrenadante permaneceram inalteradas nos poços (Fig. 1).

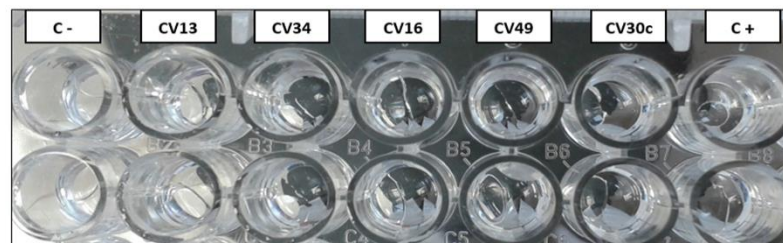


Fig. 1. Teste *drop-collapse*.

A leitura visual do teste *drop-collapse* com as seis linhagens bacterianas CV03, CV35b, EM46, CV36, EM52 e EM41, de origem cavernícola, demonstrou espalhamento parcial em alguns poços (A2; B2; A3; B5; A6; B6, A7; B7) (Fig. 2). Para confirmar este resultado, foi realizado o ensaio de emulsificação (E24), e verificou-se que não houve produção significativa de biosurfactantes por nenhuma das linhagens bacterianas. Em todos os tubos houve um nível muito baixo de emulsificação, considerado negativo ou não promissor.

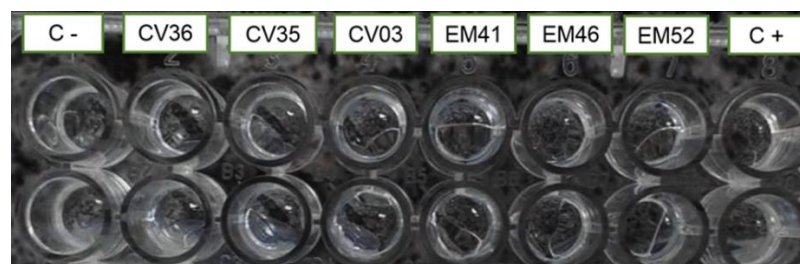


Fig. 2. Teste *drop-collapse*. Espalhamento parcial nos poços A2; B2; A3; B5; A6; B6, A7; B7.

Na prospecção das linhagens bacterianas EM09, EM14, EM31, EM42, EM48, EM56 e EM57, também de origem cavernícola, a leitura visual do teste *drop-collapse* mostrou espalhamento parcial em alguns poços



V Seminário de Iniciação Científica

Talentos da Ciência e Tecnologia em ação

Dias 26 e 27 de setembro de 2019

Auditório e Pátio - Unidade II

UNIFESSPA | PROPIT

(C2; D2; C3; C4; C5; C6; D6) (Fig. 3). Porém, através do ensaio de emulsificação verificou-se que não houve produção significativa de biossurfactantes por nenhuma destas linhagens bacterianas.

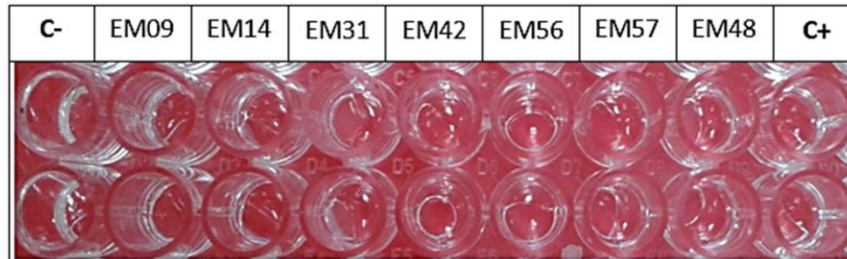


Fig. 3. Teste *drop-collapse*. Espalhamento parcial nos poços C2; D2; C3; C4; C5; C6; D6.

A partir das amostras de solos provenientes de áreas em processo de recuperação de minério, cultivadas em meios seletivos com metal e óleo diesel, foram isoladas 45 linhagens bacterianas, sendo 29 do meio suplementado com óleo diesel e 16 do meio suplementado com 100ppm de metais (cobre, zinco e chumbo). Das 45 linhagens bacterianas isoladas, 10 apresentaram atividade tensoativa no teste *drop-collapse*. Das 10 linhagens bacterianas selecionadas, 3 apresentaram produção de emulsificado (Figura 4A). A linhagem bacteriana FL01-01 apresentou índice de emulsificação de 56,7% e crescimento microbiano com D.O. de 2.136 (Figura 4B); a NA02-03 apresentou índice de emulsificação de 56,2% e crescimento microbiano com D.O. de 1.712 (Figura 4C); e a PA01-02 apresentou índice de emulsificação de 61,8% e o maior crescimento microbiano, com D.O de 2.325; após 5 dias de incubação (Figura 4D).

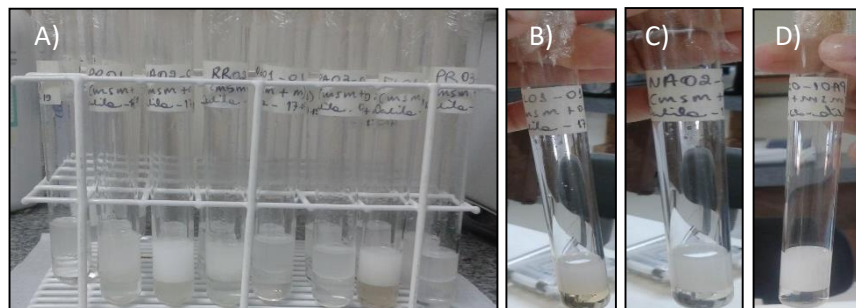


Figura 4. Ensaio de emulsificação (A): linhagens FL01-01 (B), NA02-03 (C) e PA01-02 (D).

O índice de emulsificação é uma análise qualitativa que determina indiretamente a presença de biossurfactante no caldo livre de células, por meio da formação e da estabilidade do emulsificado (PAZ et al., 2006), quanto maior for o valor do índice de emulsificação, maior será a capacidade do microrganismo em produzir emulsificado. Pinto, Martins e Costa (2009) consideram que um bom agente emulsificante apresenta a habilidade de formar pelo menos 50% emulsão e mantê-lo estável no período de 24 horas, utilizando óleo a base de hidrocarboneto na determinação do índice de emulsificação.

Os resultados também evidenciaram a importância da escolha do local de coleta das amostras, visto que locais já impactados possuem maior probabilidade de ocorrência de espécies resistentes à degradação (YOUSSEF, 2004), como resposta da interação entre o microrganismo e o ambiente circundante, sendo a produção desses metabólitos uma importante ferramenta para a sobrevivência desses microrganismos.

As células bacterianas foram identificadas como bacilos gram-negativos, isolados, curtos e alongados (Figura. 5).

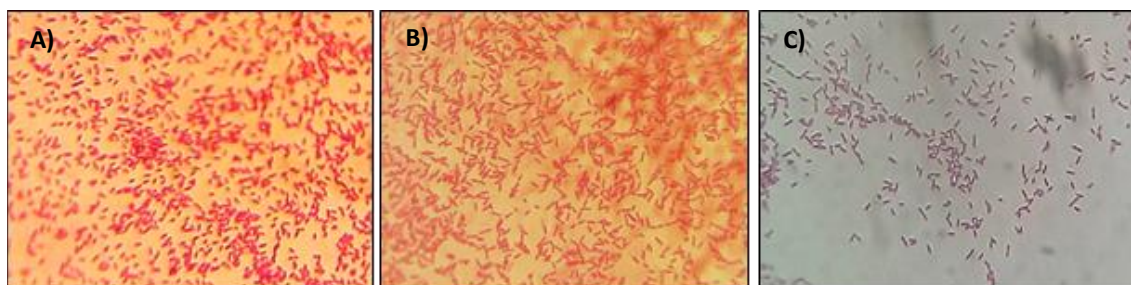


Figura 5. Coloração de Gram das linhagens bacterianas FL01-01 (A), NA02-03 (B) e PA01-02 (C).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que as bactérias originadas de solos de cavernas não foram produtoras de biossurfactantes neste estudo. Já em relação às bactérias coletadas em solo impactados pela mineração, foram selecionadas linhagens resistentes à metais, degradadoras de óleo diesel e produtoras de surfactantes. A descoberta destas novas espécies de bactérias produtoras de biossurfactantes são de grande relevância para potenciais aplicações biotecnológicas, como a biorremediação. Os resultados também evidenciaram a importância da escolha do local de coleta das amostras, que demonstra a interação entre o microrganismo e o ambiente circundante.

REFERÊNCIAS

- BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- BUENO, S.M.; SILVA A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H. Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1572-1577, 2010.
- DECESARO, A.; RIGON, M. R.; THOMÉ, A.; COLLA, L. M. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 947-954, 2013.
- LI, C.; BAI, J.; CAI, Z.; OUYANG, F. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using a response surface methodology. **Journal Biotechnology**, v.93, p.27-34, 2002.
- LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloids Surf. B**, v. 102, p. 202-209, 2013.
- PAZ, M. C. F.; CEBALLOS, B. S. O.; ALBUQUERQUE, C. D. C.; CAMPOS-TAKAK, G. M. Influência de cloreto de sódio e de cobre na produção de biomassa e biosurfactante por uma nova amostra de *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, n. 1, p. 56-64, 2006.
- PEIXOTO, R. M.; **Bioprospeção de microrganismos do gênero *Pseudomonas* produtores de biossurfactantes**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- PINTO, M. H.; MARTINS, R. G.; COSTA, J. A. V. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Química Nova**, v. 32, n.8, p. 2104-2108, 2009.
- SANTOS, S. C.; CASTRO, D. C. M.; ASSUNÇÃO, P. S.; SANTOS, T. L.; QUINTELLA, C. M. Mapeamento Tecnológico de Processos Microbianos Aplicados na Biorremediação de Metais Pesados. **Cadernos de Prospecção**, v. 11, n. 5, p. 1740-1751, 2018.
- 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.