



**POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES EM BACTÉRIAS  
ISOLADAS DE MACRÓFITA AQUÁTICA NA AMAZÔNIA**

Ieda Hortêncio Batista<sup>1</sup>  
Carlossandro Carvalho de Albuquerque<sup>2</sup>  
Francisca da Silva Ferreira<sup>3</sup>  
Valdir Florêncio Veiga Jr<sup>4</sup>  
José Odair Pereira<sup>5</sup>

**Resumo**

No processo de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo há relação direta entre a degradação destes compostos e a produção de biossurfactantes. Estas moléculas têm despertado grande interesse comercial pelo menor custo e maior eficiência do que os surfactantes sintéticos. Neste estudo foi verificado o potencial para a produção de biossurfactantes por meio da avaliação da atividade de emulsificação em cepas bacterianas isoladas em meio seletivo a partir da macrófita aquática amazônica *Eichornnia crassipes* e selecionadas aquelas com maior potencial. O crescimento de linhagens foi avaliado em meio mineral com mistura de hidrocarbonetos e em meio mineral com petróleo bruto. O índice de toxicidade foi avaliado nos extratos dos meios com mistura de hidrocarbonetos das cinco linhagens que apresentaram melhor crescimento. No meio com petróleo bruto verificou-se melhor crescimento bacteriano, destacando-se a cepa *Stenotrophomonas sp.* que atingiu cerca de  $13,4 \times 10^6$  UFCs/mL. O crescimento bacteriano nos meios utilizados indicou a degradação dos hidrocarbonetos de petróleo, considerando que estes eram a única fonte de carbono. As linhagens que demonstraram melhores resultados foram *Stenotrophomonas sp.*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Methylobacterium radiotolerans* e *Acinetobacter baumannii*. Destacaram-se na produção de biossurfactantes as linhagens *Stenotrophomonas sp.* e *Methylobacterium radiotolerans*, com melhores resultados no meio com petróleo. Os índices de toxicidade mostraram melhores resultados nos extratos do crescimento bacteriano em comparação aos extratos controles. Assim, considera-se que as linhagens estudadas apresentam importante potencial como produtoras de biossurfactantes merecendo estudos adicionais para comprovação desta produção.

**Palavras-chave:** Bactérias; macrófita; biossurfactantes; biorremediação; Amazônia.

**Abstract**

In the process of petroleum hydrocarbon biodegradation is a direct relationship between the degradation of these compounds and the production of biosurfactants. These molecules have attracted much commercial interest because its lower cost and higher efficiency than synthetic surfactants. This study verified the potential for the production of biosurfactants by evaluating emulsification activity in bacterial strains isolated in selective medium from the Amazon macrophyte *Eichornnia crassipes* and selected those with the greatest potential. Growth of strains was evaluated in mineral medium with hydrocarbon mixture and mineral medium with crude oil. The index of toxicity was evaluated in extracts of media with hydrocarbon mixture of five linhagens that showed better growth. In the middle with crude oil there was better bacterial growth, highlighting the strain *Stenotrophomonas sp.* which reached about  $13,4 \times 10^6$  CFUs / mL. The bacterial growth in the media used indicated the degradation of petroleum hydrocarbons, considering that these were the only carbon source. The strains that showed best results were *Stenotrophomonas sp.*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Methylobacterium radiotolerans* and *Acinetobacter baumannii*. They stood out in the production of biosurfactants the *Stenotrophomonas sp.* strains and *Methylobacterium radiotolerans*, with better results in the middle with oil. The indices of toxicity showed better results in extracts of bacterial growth compared to the extracts controls. Thus, it is considered that the studied strains have significant potential as biosurfactants producing deserves additional studies to prove this production.

**Keywords:** Bacteria; macrophyte, biosurfactants bioremediation, Amazon.

<sup>1</sup> Doutora em Biotecnologia-UFAM. Professora da Universidade do Estado do Amazonas. [jedahbatista@gmail.com](mailto:jedahbatista@gmail.com)

<sup>2</sup> Doutor em Geografia-UFC. Professor da Universidade do Estado do Amazonas. [carlossandro.albuquerque@gmail.com](mailto:carlossandro.albuquerque@gmail.com)

<sup>3</sup> Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais-MBT-UEA. Professora da Universidade do Estado do Amazonas. [fransferreirauea@gmail.com](mailto:fransferreirauea@gmail.com)

<sup>4</sup> Doutor em Química- UFRJ. Professor da Universidade Federal do Amazonas. [valdirveiga@ufam.edu.br](mailto:valdirveiga@ufam.edu.br)

<sup>5</sup> Doutor em Genética e melhoramento de plantas- ESALQ-SP. Professor da Universidade Federal do Amazonas. [jodair@ufam.edu.br](mailto:jodair@ufam.edu.br)



## Introdução

Compostos com propriedades emulsificantes são sintetizados por uma grande variedade de organismos vivos, sendo denominados biossurfactantes quando produzidos por microrganismos (BENTO; CAMARGO & GAYLARDE, 2008). Estão diretamente envolvidos na remoção de petróleo e derivados do ambiente, sendo produzidos por diferentes linhagens de fungos e bactérias (BICCA; FLECK & AYUB, 1999).

Silva *et al* (2003) destacam que os biossurfactantes são produzidos, majoritariamente por bactérias aeróbias em meio de cultura líquida e possuem atividade intra ou extracelular. Afirmam ainda que devido às propriedades físico-químicas, os biossurfactantes são melhores que os sintéticos para aplicação na indústria de petróleo, pois os sintéticos, disponíveis no mercado, podem levar à perdas na biodiversidade e alterações nas características físico-químicas e ambientais. Assim, os biossurfactantes têm sido reconhecidos como substitutos parciais ou totais dos surfactantes sintéticos, sendo considerados com características superiores aos sintéticos na indústria petrolífera e de óleos (ROCHA *et al*, 1992; MULLIGAN, 2005).

A busca de cepas bacterianas produtoras de surfactantes visa o emprego potencial destas substâncias em alimentos e indústrias têxteis, restauração ambiental e recuperação de óleos em poços de petróleo, solo e sedimento (SILVA *et al*, 2003). O potencial de aplicação dos biossurfactantes baseia-se em suas propriedades funcionais, que incluem emulsificação, demulsificação, separação, solubilização e redução da tensão superficial (COLLA & COSTA, 2003). Essas propriedades são aplicadas na agricultura, na construção civil, em indústrias de alimentos, papel, metal, têxteis e farmacêuticas, apresentando seu maior potencial de aplicação na indústria petrolífera, principalmente na limpeza de tanques, na recuperação melhorada de petróleo e em casos de biorremediação, como em derramamentos de óleos em ecossistemas aquáticos (COLLA & COSTA, 2003).

Batista (2002) afirma que os surfactantes microbianos são moléculas complexas e compreendem compostos de uma grande variedade de classes químicas, incluindo os peptídeos, ácidos graxos, fosfolipídeos, glicolipídeos e lipopeptídeos.

Bento, Camargo & Gaylarde (2008) destacam que várias espécies de microrganismos são reconhecidas por produzirem vários tipos de biossurfactantes. Citam alguns disponíveis comercialmente: surfactina, produzida pelo *Bacillus subtilis*, o emulsan produzido pelo



*Acinetobacter calcoaceticus* RAG1, e um ramnolipídio produzido por *Pseudomonas aeruginosa*.

Pela grande variedade de aplicações dos biossurfactantes, pelo reconhecido potencial industrial e inúmeras aplicações biotecnológicas, tem-se nesta área de investigação, um desafio relacionado à prospecção de espécies produtoras, assim como dos métodos de análise, extração, purificação e otimização desta produção.

Este estudo teve por objetivos verificar a produção de biossurfactantes por linhagens bacterianas selecionadas de cepas isoladas da macrófita aquática *Eichornia crassipes* e avaliar a cinética de crescimento de bactérias degradadoras em meio líquido suplementado com petróleo bruto e mistura de hidrocarbonetos. Realizou-se ainda teste de toxicidade em extratos bacterianos, avaliando-se a possibilidade de uso das linhagens selecionadas para futuros processos de biorremediação.

## **Materiais e Método**

### **Microorganismos**

Foram inicialmente utilizadas neste estudo 40 cepas bacterianas isoladas da macrófita aquática amazônica *Eichornia crassipes* coletada nos efluentes da Refinaria de Manaus, Am (REMAN). As nove linhagens selecionadas para os testes de potencial de emulsificação foram identificadas através da região do DNA ribossomal 16S com comparação com sequências do Gen Bank no laboratório de Genética de Microorganismos da Universidade Federal do Amazonas como: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Stenotrophomonas sp*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, *Pantoea sp*, *Acinetobacter baumannii*, *Methylobacterium radiotolerans* e *Bacillus subtilis*. Apenas uma não pode ser identificada. Estas cepas estão preservadas em glicerol a 30% a 4° C.

### **Pré-inóculo e fase de adaptação**

As quarenta cepas foram cultivadas em tubos rosqueados contendo meio Luria Bertani (10g de Peptona bacteriológica, 5 g de NaCl, 10 g de extrato de levedura, 116 g de Agar, 1000 ml de água destilada, pH 7,5) a 30° C, sob agitação de 120 rpm, por 24 horas, resultando em colônias de cerca de  $2 \times 10^8$  que foram utilizadas como pré-inóculo. Em erlenmeyers de 250ml



contendo 100 ml de meio mineral (12,10 g de Tris-hidroximetil-aminometano (0,1 M), 23 g de NaCl, 0,75 g de KCl, 1,47 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 5,08 g de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 6,16 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 3,74 g de NH<sub>4</sub>Cl, 2 mL de Solução de Sulfato de Ferro-1g/L, 4 mL de Solução de Fosfato de Sódio-0,1M, 1000 mL de água destilada, 2 mL de fungicida, pH 7,3) acrescido de 0,5 ml de petróleo de Urucu foram adicionados 0,3 ml do inóculo padrão e deixados à 30° C sob agitação de 120 rpm por mais 24 horas. Após esse período os inóculos foram plaqueados em meio LB e incubados a 30° C por 24 horas. Colônia destas placas foram utilizadas para produzir um inóculo de cerca de 10<sup>2</sup> UFC/mL.

### **Teste qualitativo do colapso da gota de óleo**

O potencial das cepas em utilizar o petróleo como fonte de carbono e produzirem biosurfactantes foi previamente verificado por meio do teste qualitativo do colapso da gota de óleo (BODOUR & MILLER-MAIER, 1998). Este teste permitiu a seleção das bactérias utilizadas neste trabalho. O teste foi realizado em placas multipoços contendo 2 mL de meio mineral, 1 µl do inóculo e uma gota de petróleo de Urucu. O teste com cada bactéria foi realizado em triplicata fotografado no tempo zero e após sete dias. O resultado foi considerado positivo quando houve a formação de microemulsões na gota de petróleo, avaliadas pela comparação com os poços em foi inoculado 1 µl de água deionizada utilizada como controle negativo.

### **Produção de biosurfactantes**

Nove cepas bacterianas selecionadas após o teste do colapso da gota foram cultivadas em 100 ml de meio mineral acrescido de 0,5 ml de petróleo de Urucu em erlenmeyers de 250 ml. Foram utilizados como controles frascos contendo o mesmo meio com o petróleo, porém sem bactérias e frascos contendo meio mineral e bactéria, mas sem petróleo. Os frascos ficaram incubados a 30° C em agitador rotatório a 120 rpm para conferir aeração adequada, por um período de 09 dias. O pH inicial e final de cada amostra foi aferido para verificar se houve interferência neste parâmetro químico.



Em um segundo experimento as mesmas cepas foram incubadas nas mesmas condições do experimento anterior, com o mesmo meio mineral porém sem o petróleo e acrescido de mistura de hidrocarbonetos nas seguintes concentrações:

<b>HIDROCARBONETO</b>	<b>CONCENTRAÇÃO</b> %
Tetradecano	0,005
Tridecano	0,005
Fenildecano	0,005
Hexadeceno	0,005
Pireno	0,005
Benzo-a-pireno	0,005
Fenantreno	0,005
Naftaleno	0,005

### **Crescimento celular**

Foi avaliado o crescimento celular de cada cepa tanto no meio com petróleo de Urucu quanto no meio com a mistura de hidrocarbonetos, através da estimativa do número de células viáveis ou unidades formadoras de colônias (UFCs), utilizando-se a técnica *spread plate* ou espalhamento em placas. Foram coletadas alíquotas de 0,1 ml de cada amostra, em intervalos de 12 horas até o total de 204 horas. A partir destas alíquotas foram feitas diluições da ordem 1/10 até a diluição  $10^{-4}$  em 0,9 ml do mesmo meio mineral sem o petróleo e espalhadas em placas de petri contendo meio Luria Bertani. As placas foram incubadas a 30° C por 24 horas para contagem das colônias. Só foram contadas as placas com colônias visivelmente individualizadas.

### **Avaliação da atividade de emulsificação**

A produção de surfactantes foi avaliada a partir da análise da atividade de emulsificação A/O (água em óleo) e O/A (óleo em água). Foram realizados experimentos com os meios de cultura utilizados para o crescimento das bactérias no item anterior. Após período de incubação, foram retiradas alíquotas do meio, após centrifugação, para verificação da capacidade de



emulsão de cada bactéria. Para cada 3,5 ml das culturas, foi adicionado 3,5 ml de tolueno (experimento 1) e petróleo de urucu (experimento 2) em tubos de ensaio que foram agitados durante 2 minutos em vortex e deixados 24 horas em repouso. Após esse período, a altura do petróleo emulsificado (cm) foi comparada à altura total adicionada (COOPER & GOLDENBERG, 1987).

A atividade de emulsificação foi medida pela densidade óptica da emulsão óleo em água em espectrofotômetro com medida de 610 nm de absorbância (10). Dias (2007) descreve que no caso da emulsificação O/A, os hidrocarbonetos estarão disponíveis no próprio meio, enquanto que nas emulsões A/O os hidrocarbonetos estão acima do meio.

## **Teste de toxicidade**

O teste de toxicidade foi realizado de acordo com metodologia descrita por Dias (2007). Foram selecionadas as cinco melhores linhagens de acordo com os resultados da produção de surfactantes e do crescimento bacteriano. As linhagens foram inoculadas em meio mineral acrescido de petróleo e incubadas por 10 dias. Alíquotas foram retiradas dos sobrenadantes e filtradas em membrana Millipore 0,22  $\mu\text{m}$ . O filtrado foi diluído em diferentes concentrações: 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,56% em água destilada esterilizada. Foram retirados 2mL de cada concentração para embeber discos de papel de filtro, que foram colocados no interior de placas de Petri de poliestireno (9cm de diâmetro) (9). O controle positivo de toxicidade consistiu em embeber o papel de filtro em 2 mL de NaCl (5 g/L) e o controle negativo, em água destilada. Em cada placa inoculou-se 50 sementes de alface e estas foram envoltas em papel alumínio por 48 horas, incubadas em temperatura ambiente. Foi realizada após esse período a medida do tamanho das raízes germinadas com auxílio de papel milimetrado (4). A porcentagem de variação de crescimento foi calculada segundo a equação: % variação de crescimento = comprimento médio da amostra – comprimento médio do controle x 100 / comprimento médio do controle (9). A concentração efetiva que inibiu 50% da germinação e alongamento das raízes foi calculada pela equação correspondente à curva de regressão (valores médios de crescimento pelas concentrações de diluição correspondentes) e o valor de R<sup>2</sup> da equação.

## **Resultados**

### **Teste qualitativo do colapso da gota de óleo**



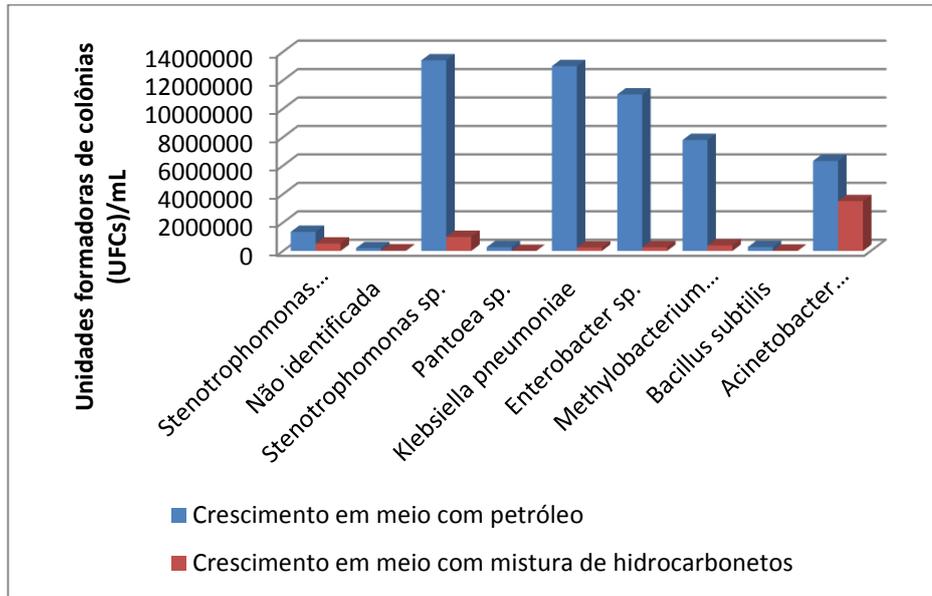
O teste do colapso da gota para verificação do potencial das cepas em produzirem biosurfactantes demonstrou que a maioria das bactérias analisadas sintetiza algum tipo de surfactante. Fato observado pela transformação da gota de óleo em micro emulsões após uma semana de crescimento.

Algumas bactérias demonstraram maior habilidade na quebra da gota de óleo, permitindo a seleção de nove cepas para os testes de emulsificação.

## **Crescimento celular**

Foi observado que houve uma fase de latência de algumas horas, a partir da qual, as linhagens entraram em fase exponencial de crescimento, atingindo o máximo de produção de biomassa em tempos variando entre 48 e 96 horas, seguida de fase de declínio. Considerando, que a densidade inicial da cultura era cerca de  $10^2$ ufc/mL, e que ao final da fase exponencial, essa densidade chegou ao limite de  $10^6$ ufc/mL, pode-se confirmar a degradação de hidrocarbonetos pelas bactérias, já que eram a única fonte de carbono no meio.

As linhagens apresentaram melhor crescimento celular no meio de cultura acrescido de petróleo. Observou-se que as espécies *Stenotrophomonas sp.* (EF2I28), *Klebsiella sp.* (EF1I29), *Enterobacter sp.* (ER2I48), *Methylobacterium radiotolerans* (EFI52) e *Acinetobacter baumannii* (EFK6) obtiveram melhores resultados no meio com petróleo bruto. Destacaram-se no meio com a mistura de hidrocarbonetos as linhagens *Stenotrophomonas maltophilia*, *stenotrophomonas sp* e *acinetobacter baumannii*. A diferença de crescimento nos dois meios foi significativa, conforme se pode observar na Figura 1.



**Figura 1-** Comparação do crescimento bacteriano em meio com petróleo e em meio com mistura de hidrocarbonetos

Não houve variações significativas no pH que iniciou em 7,3 e finalizou na faixa de 6,9 a 7.2, tanto no meio com petróleo quanto no meio com os hidrocarbonetos padrões.

### Atividade de emulsificação

Os resultados dos experimentos para avaliação das atividades de emulsificação apresentaram para as bactérias crescidas no meio com petróleo, o total de três linhagens com atividade emulsificante de moderada a alta do tipo água em óleo, nos valores de 1,5 a 2,3 em destaque na Tabela 1. A bactéria *Stenotrophomonas sp.* destacou-se na formação do halo indicador da produção de surfactante. Para a atividade tipo óleo em água, destacaram-se duas bactérias com produção máxima de 0,913 em petróleo e 0,961 em tolueno (Em destaque na Tabela 1).

**Tabela 1-** Atividades de emulsificação em petróleo (P) e tolueno (T) nos extratos das bactérias que cresceram no petróleo.

	ATIVIDADE DE EMULSIFICAÇÃO
--	----------------------------



Cepa	Densidade óptica Tipo óleo em água		Altura da emulsão (cm) – Tipo água em óleo	
	P	T	P	T
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,240	0,317	0,5	0,04
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,022	0,414	<b>1,8</b>	<b>1,5</b>
Não identificada	0,005	0,014	0,05	0,03
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	0,051	0,025	<b>2,3</b>	<b>1,9</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<b>0,913</b>	0,849	0,05	0,01
<i>Pantoea sp.</i>	0,110	0,117	0,05	0
<i>Enterobacter sp.</i>	0,012	0,026	<b>2,0</b>	0,02
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	0,711	<b>0,961</b>	0,05	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0,012	0,173	0,04	0

As bactérias crescidas no meio com a mistura de hidrocarbonetos demonstraram uma menor produção de surfactantes. Neste meio três linhagens apresentaram atividade emulsificante moderadas. Do tipo água em óleo se destaca a *Stenotrophomonas sp.* e do tipo óleo em água a *Klebsiella sp.* com os maiores valores (Em destaque na Tabela 3).

**Tabela 2** - Atividades de emulsificação em petróleo (P) e tolueno (T) nos extratos das bactérias que cresceram nos hidrocarbonetos padrões.

Cepa	ATIVIDADE DE EMULSIFICAÇÃO			
	Densidade óptica		Altura da emulsão (cm)	
	P	T	P	T
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,050	0,123	0,02	0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,012	0,025	0,6	0,02
Não identificada	0,001	0	0	0
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	0,230	0,020	<b>1,6</b>	0,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<b>0,540</b>	<b>0,779</b>	0	0
<i>Pantoea sp.</i>	0,003	0,001	0	0
<i>Enterobacter sp.</i>	0,290	0,445	0,05	0,01
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	0,543	0,735	0,23	0,10



<i>Bacillus subtilis</i>	0,329	0,044	0	0
--------------------------	-------	-------	---	---

### Avaliação da toxicidade

A Tabela 4 apresenta, de acordo com a ordem crescente de concentração das amostras, os efeitos tóxicos dos extratos bacterianos na germinação e alongamento das raízes das sementes, verificando a concentração efetiva que causou 50% (CE50) da inibição de germinação e crescimento radicular.

**Tabela 3** - Concentrações efetivas (%) que causam 50% de inibição de germinação

Amostras/Inibição de Germinação (%) para os hidrocarbonetos						
Concent. (%)	Controle abiótico	1*	2**	3***	4****	5*****
1,56	16,35	1,89	23,89	5,03	7,55	6,66
3,125	17,6	22,64	22,64	16,35	18,86	37,11
6,25	34,59	21,38	43,39	27,67	36,85	41,59
12,5	100	87,42	40,25	43,39	52,2	48,43
25	100	100	100	100	100	100
50	100	100	100	100	100	100
Equação (y=50)	30,115*L n	25,215*L n	30,5535*L n	32,4976*L n	29,7093*L n	27,2875*L n
R <sup>2</sup>	-4,193	0,0862	-17,8327	-15,2537	-12,1566	-3,8247
*****EC <sub>50</sub>	6,0466	7,2391	9,2085	7,4481	8,1024	7,187

\*1 *Stenotrophomonas sp.*; 2\*\**Klebsiella pneumoniae*; 3\*\*\**Enterobacter sp.*; 4\*\*\*\**Methilobacterium radiotolerans*; 5\*\*\*\*\**Acinetobacter baumannii*

\*\*\*\*\* EC<sub>50</sub> : Concentração efetiva de toxicidade para 50% das sementes

Os resultados destacam que a bactéria identificada como *Klebsiella sp.* teve o menor efeito tóxico sobre o bioindicador utilizado (9,2085%), considerando que este valor indica a concentração efetiva para inibir a germinação e alongamento de raiz para 50% das sementes testadas. No presente estudo os extratos das cinco bactérias avaliadas obtiveram valores da EC<sub>50</sub> maiores do que o do controle abiótico (Tabela 5). Este fato indica que todos os extratos bacterianos apresentaram menor efeito tóxico sobre as sementes de alface, quando comparados ao extrato sem as bactérias. Em muitos casos, a presença da bactéria pode levar ao surgimento de substâncias menos tóxicas do que as originalmente existentes.

### Discussão



Os resultados positivos obtidos no teste do colapso da gota de óleo demonstram o potencial das bactérias isoladas da macrófita *Eichornnia crassipes* em produzir algum tipo de surfactante. Silva et al (2003) em estudo com bactérias isoladas da coluna d'água da alga *Grateloupia sp.* e do sedimento meso litoral da praia de Boa Viagem-RJ observou o colapso da gota de óleo em experimento com os extratos do crescimento bacteriano e adição de óleo árabe leve nos primeiros cinco minutos. Savergnini et al (2004) também obteve resultados positivos para os testes que realizou com consórcio bacterianos isolados de talos de algas e incubados com compostos aromáticos.

No presente estudo observou-se crescimento bacteriano nos meios com petróleo e com mistura de hidrocarbonetos, o que permite inferir que estas linhagens apresentam a capacidade de utilizar estes compostos como fonte de carbono energia. Dias (2007) ao realizar experimentos sobre crescimento celular com 43 linhagens de bactérias isoladas de solos contaminados com hidrocarbonetos, utilizou o peso seco bacteriano como parâmetro. Este autor registrou o crescimento das melhores linhagens na ordem de 0,00022 g/mL em hidrocarbonetos lineares e variando de 0,00033 g/mL a 0,00043 g/mL em hidrocarbonetos aromáticos. Em estudo com as bactérias *Planococcus citreus* e *Pantoea agglomerans*, Jacobucci (2000) utilizou meios com efluentes de derivados de petróleo e, também utilizando o peso seco, observou crescimento de 1,826 mg/mL para a primeira bactéria e 2,478 mg/mL para a segunda. Nos estudos de Dias (2007) também foi observado que os valores do pH das amostras pouco se desviaram dos valores iniciais. Rosato (1997) descreve que a maioria dos microrganismos apresentam melhor desenvolvimento em pH neutro, podendo ocorrer o dobro da taxa de biodegradação de petróleo com a correção do pH.

Dias (2007) destaca que o crescimento celular está diretamente relacionado com a produção de biossurfactantes. Kushida (2000) demonstrou que houve aumento na produção de biomassa, na produção de biossurfactantes e uma diminuição gradativa do óleo residual, com o aumento do tempo de contato entre a cepa *Planococcus citreus* e o óleo residual utilizado.

Neste estudo a linhagem *Acinetobacter baumannii* apresentou maiores valores de crescimento em meio com mistura de hidrocarbonetos, entretanto não apresentou os maiores valores de atividade emulsificante. A diminuição da atividade emulsificante poderia ser explicada pelo consumo dos biossurfactantes produzidos. Considerando que muitos desses compostos são proteínas, carboidratos, lipídios ou misturas desses compostos, é possível



especular que em uma situação de estresse, a bactéria recorra a esta fonte de matéria orgânica para sua sobrevivência. Outra explicação plausível seria a neutralização da atividade emulsificante como consequência de reações químicas entre metabólitos gerados em um sistema fechado (MACIEL, 2003).

Matsuura (2004), estudando microrganismos provenientes da região amazônica, encontrou seis linhagens de leveduras com atividade emulsificante significativas do tipo água em óleo, com a formação de uma emulsão de 2,3 cm de altura. Esse valor foi o mesmo encontrado neste estudo para a bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* quando crescida em meio mineral acrescido de petróleo. Matsuura (2004) obteve, entre as leveduras, um máximo de atividade do tipo óleo em água com densidade óptica de 0,93 por uma das linhagens. Carvalho, Marchi e Durrant (1997) obtiveram com a bactéria *Planococcus citreus* a densidade óptica de 1,8. Dias (2007) encontrou valores de emulsão do tipo óleo em água em linhagens com crescimento em presença de hidrocarbonetos lineares de 0,890 e em linhagens com crescimento em presença de hidrocarbonetos aromáticos de 0,1308. NEVES (2006) obteve atividade de emulsificação de óleo em água para a linhagem *Bacillus badius*, utilizando meio de cultura para produção de biossurfactante, adicionado de uma mistura de Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Naftaleno, Antraceno, Fluoreno e Pireno) no valor de 0,018 em seis dias de cultivo. Maciel (2003) destacou o potencial para a produção de biossurfactantes extracelulares em bactérias preliminarmente identificadas, como *Acinetobacter* spp. e *Bacillus* spp, isoladas a partir de uma amostra de água de descarga, contaminada com óleo, de num navio petroleiro, na costa cearense.

O teste de avaliação da toxicidade permite considerar que os extratos bacterianos apresentaram menor efeito tóxico sobre o bioindicador utilizado do que o extrato controle, confirmando a possibilidade do uso dessas linhagens em futuros processos de biorremediação. Dias (2007) ao realizar este teste também com linhagens bacterianas encontrou valores da ordem de 7,93% para extratos de linhagens crescidas em meio com hidrocarbonetos lineares e de 13,1% para extratos de linhagens em meio com hidrocarbonetos aromáticos. Destaca em seu estudo linhagens com alto percentual de degradação de hidrocarbonetos que apresentaram valores na ordem de 3,2% e 3,38% para os testes de toxicidade, sendo que o controle obteve o valor de 4,08.

## Conclusão



As linhagens bacterianas utilizadas nos experimentos deste estudo demonstraram potencial para a produção de biossurfactantes; as espécies epifíticas isoladas da macrófita aquática *Eichornia crassipes* e identificadas preliminarmente como *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, e *Methilobacterium radiotolerans* e as endofíticas *Stenotrophomonas sp* e *Acinetobacter baumannii* demonstraram maior potencial entre as nove linhagens testadas. Os meios metabólicos obtidos nos ensaios de biodegradação apresentaram menor toxicidade que os meios utilizados como controle. São necessários testes adicionais, como o de patogenicidade para confirmar a possibilidade do uso dessas linhagens para obtenção de biossurfactantes.

## Referências

- BATISTA, S. B. **Bactérias de Ambientes Contaminados Com Petróleo ou Derivados Produtoras de Surfactantes e Emulsificantes**. Minas Gerais, 2002, 32p. (Ph.D.Thesis. Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola)
- BENTO, Fátima M.; CAMARGO, Flávio A.O.; GAYLARDE, Christine C. Biossurfactantes. In MELO, Itamar S. & AZEVEDO, João L.(Eds) **Microbiologia Ambiental**. 2 ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008.
- BICCA, Flávio C.; FLECK, Leonardo C. & AYUB; Marcos Antônio Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, 30:231-236, 1999.
- BODOUR, A.A; MILLER-MAIER, R.M. Application of modified drop-collapse technique for surfactant quantification and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal Microbiology Methods**, 32:273-280, 1998.
- CARVALHO, D.; MARCHI, D. D.; DURRANT, L. R. Production of extracellular surface-active compounds by microorganisms grown on hydrocarbons. In: **INTERNATIONAL IN SITU AND ON-SITE BIOREMEDIATION SYMPOSIUM**, 4, 1997, New Orleans. Columbus: Battelle Press, 4: 91 – 97, 1997.
- COLLA, L. M. & COSTA, J. A. V.; Obtenção e Aplicação de Biossurfactantes. **Vetor**, 13:85-103, 2003.
- COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, 53: p.224-229, 1987.



- DIAS, Fábio G. **Utilização de consórcio microbiano para biorremediação do meio ambiente contaminado com derivados de petróleo.** São Paulo, 2007, 106 p. (Ph.D. Thesis. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas).
- DUTKA, B. J. (Ed). **Methods for Microbiological and Toxicological Analysis of Waters, Wastewaters and Sediments,** National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canadá, 1989.
- JACOBUCCI CARVALHO, D. F. **Estudo da influência de biossurfactantes na biorremediação de efluentes oleosos.** Campinas, 2000, 117p. (MSc.Thesis- Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP).
- JOHNSON, V.; SINGH, M.; SAINI, V. S.; ADHIKARI, D. K.; SITA, V. E YADAV, N. K. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. **London: Biotechnology Letters.** 6: 487 – 490, 1992.
- KUSHIDA, M. M. **Caracterização parcial e propriedades de biossurfactantes bacterianos.** Campinas, 2000. 78 p. (MSc. Thesis – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP).
- MACIEL, I. C. T. **Avaliação do Potencial de Bactérias para Degradar Derivados do Petróleo e Produzir Biossurfactantes.** Fortaleza. CE. 2003, 41p. (MSc. Thesis, Universidade Federal do Ceará).
- MATSUURA, Ani Beatriz J. **Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação.** Campinas, 2004, 82 p. (Ph.D. Thesis. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas).
- MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental pollution.** 133:183-198, 2005.
- NEVES, Kilma Cristiane S.; PORTO, Ana Lúcia F.; TEIXEIRA, Maria Francisca S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. **Acta Amazônica,** 36: 299-306, 2006.
- ROCHA, C.; SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G. ; VIERMA, L. Biosurfactant production by two isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology,** 8: 125-128, 1992.
- ROSATO, Yoko Bomura. Biodegradação do Petróleo. In MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia ambiental.** Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1997.
- SAVERGNINI, Fernanda; GUERRA, Leandro V.; BARCELOS, Mabel A.; CRAPEZ, Mirian A.C. **Produção de surfactante por consórcios bacterianos isolados de substratos marinhos**



**sob a influência de compostos aromáticos.** 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 2004.

SILVA, Frederico S.; CRAPEZ, Mirian A. C.; BISPO, Maria das Graças S; KREPSKY, Natascha; FONTANA, Luiz F.; PIMENTA, Alessandro L.; SAVERGNINI, Fernanda; VASCONCELOS, Marcelo A.; TEIXEIRA, Valéria L. **Produção de surfactante por bactérias coletadas em três substratos marinhos.** 2º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 2003

Trabalho apresentado em 18/12/2015

Aprovado em 12/02/2016