

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR CEPAS BACTERIANAS DE ORIGEM MARINHA UTILIZANDO QUEROSENE COMO FONTE DE CARBONO

Francisco Sylvânio Ferreira da Silva¹

Victor Conde Ferreira

Karla Maria Catter²

Adson Pinheiro Queiroz Viana³

Kamila Vieira de Mendonça³

Oscarina Viana de Sousa³

Regine Helena dos Fernandes Vieira⁴

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de bactérias marinhas, isoladas de região portuária de Fortaleza, Ceará, em produzir compostos biossurfactantes utilizando querosene comercial como fonte de carbono. Foram utilizadas 22 cepas bacterianas, sendo 14 provenientes de amostras de água e 8 de sedimento. Os microrganismos foram crescidos por um período de 72 horas em meio de cultura Luria Bertani (LB) tendo como única fonte de carbono o querosene na concentração de 2%. Com o sobrenadante (líquido metabólico - LM) das culturas bacterianas foram realizados os seguintes testes de avaliação da produção de biossurfactantes: colapso da gota, atividade de emulsificação, capacidade de formação e estabilidade de emulsão. Foi avaliada a capacidade dos isolados em produzir hemólise em meio Ágar Sangue, indicativo da produção de biossurfactantes. Do total de isolados, 36% obtiveram forte atividade no teste do colapso da gota, 50% produziram boas emulsões (acima de 40%), apresentando boa estabilidade até 168 horas de observação e 63% dos isolados produziram halos de hemólise. As cepas obtiveram bons resultados nos testes realizados, indicando um potencial em degradar querosene comercial, utilizando-o como fonte de carbono e produzindo compostos biossurfactantes/bioemulsificantes.

Palavras-chave: Querosene; Surfactantes Biológicos; Degradação; Emulsão.

ABSTRACT

Biosurfactant production by marine bacterial strains using kerosene as a carbon source. The aim of this work was to evaluate the ability of marine bacteria isolated from harbor region of Fortaleza, Ceará, to produce biosurfactants compounds using kerosene as the carbon source. Twenty-two strains were used, of which 14 from water samples and 8 from sediment samples. The microorganisms were grown for 72 hours in Luria Bertani (LB) using kerosene 2% as the only carbon source (v/v). The ability of these strains to produce biosurfactant compounds was investigated using the extracted supernatant from bacterial cultures (metabolic liquid, ML) through the following tests: drop collapse test, emulsification activity, formation

¹ PPG em Ciências Marinhas Tropicais, Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, CE, Brasil. E-mail para correspondência: franciscosylvaniofs@gmail.com.

² Programa Nacional de Pós-Doutorado/Capes, Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, CE, Brasil.

³ Curso de Ciências Ambientais, Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, CE, Brasil.

⁴ Curso de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, CE, Brasil.

hability and emulsion stability. The isolated bacterias hability to produce hemolysis in Blood Agar medium, indicative of biosurfactant production, was evaluated. A total of 36% of strains showed strong activity in the drop collapse test, while about 50% of strains produced emulsions higher than 40%, showing good stability until 168 hours of observation and 63% produced hemolytic activity. The isolated strains showed good results in the performed tests indicating biotechnological potential to degrade kerosene and using it as a source of carbon and produce biosurfactant/bioemulsificants compounds.

Keywords: Kerosene; Biological Surfactants; Degradation; Emulsion.

INTRODUÇÃO

Os surfactantes são compostos tensoativos com ampla utilização nos diferentes setores da indústria. Essas substâncias apresentam estrutura molecular com grupos hidrofílicos e hidrofóbicos e possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial de misturas com fases e polaridades diferentes a partir da formação de agregados moleculares ou micelas (Rodrigues *et al.*, 2010; Mahjoubi *et al.*, 2013). Muitos dos surfactantes utilizados na indústria são produzidos a partir de derivados de petróleo (Pinto *et al.*, 2009). Uma alternativa aos surfactantes sintéticos são os biosurfactantes, produzidos por microrganismos, dentre eles bactérias, fungos e leveduras, apresentando alta eficiência quando comparados aos surfactantes sintéticos (Nitschke e Pastore, 2002).

Os surfactantes produzidos por microrganismos podem ser de dois tipos: aqueles que reduzem a tensão superficial na interface ar-água chamados de biosurfactantes e os que reduzem a tensão interfacial entre líquidos imiscíveis, ou na interface sólido-líquido, denominados bioemulsificantes (Batista *et al.*, 2006). De acordo com a literatura esses termos podem ser permutáveis, embora todo bioemulsificante apresente propriedades biosurfactantes, nem todo biosurfactante é um bom emulsificante (Viramontes-Ramos *et al.*, 2010). Se comparados aos surfactantes sintéticos, os biosurfactantes são biodegradáveis, menos tóxicos e estáveis em condições extremas de temperatura, pH e salinidade (Mahjoubi *et al.*, 2013; Montagnolli *et al.*, 2015).

Os biosurfactantes podem ser classificados de acordo com seu peso molecular naqueles de baixo e os de alto peso molecular. Dentre os de baixo peso estão incluídos os glicolipídios, os fosfolipídios e os lipolipídios. Por sua vez, dentre os de alto peso molecular estão os polissacarídeos, as proteínas, as lipoproteínas e os lipopolissacarídeos (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011). Muitos microrganismos são capazes de utilizar diferentes substratos como fonte de alimento, sendo extensa a lista de substratos usados para produção de biosurfactantes, com destaque para hidrocarbonetos de petróleo (Mahjoubi *et al.*, 2013), óleo vegetal residual (Rufino *et al.*, 2014), resíduos agroindustriais (Castiglioni *et al.*, 2009; Fontes *et al.*, 2012), carboidratos (Viramontes-Ramos *et al.*, 2010), dentre outros. A produção de biosurfactantes a partir de substratos renováveis tem ganhado atenção considerável nos últimos anos (Marti *et al.*, 2015).

Os surfactantes desempenham um papel importante nos processos de remoção de poluentes em ambientes naturais, dentre eles os hidrocarbonetos de petróleo. Em derramamentos de petróleo no meio ambiente, os biosurfactantes dispersam o contaminante na água ou solo, tornando-o biodisponível para a degradação microbiana (Tonini *et al.*, 2010). O processo de degradação microbiana ocorre de forma natural no meio ambiente podendo resultar na degradação completa do contaminante ou na sua transformação em produtos inócuos (Balba *et al.*, 1998). O risco de acidentes em áreas onde há movimentação de hidro-

carbonetos em larga escala aumenta à medida que tais atividades são realizadas. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de cepas bacterianas, isoladas da área portuária de Fortaleza, em produzir compostos biossurfactantes utilizando querosene comercial como fonte de carbono.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das Cepas

Neste trabalho foram utilizadas 22 cepas bacterianas pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará. Das 22 cepas, 14 são provenientes de amostras de água e 8 de sedimento do Porto do Mucuripe, localizado na cidade de Fortaleza, CE. O sedimento no local é composto predominantemente por areia com baixo teor de cascalho e sedimentos finos (Moreira, 2013).

Isolamento das Cepas Bacterianas Potencialmente Degradoras

Foram transferidos 10 mL da amostra de água para frascos de *erlenmeyer* contendo meio *Bushnell-Haas* (Difco) acrescido de 2% de querosene (v/v). Os frascos foram incubados a 30°C com rotação mecânica de 150 rpm por 72 horas.

Após homogeneização manual, foram pesados 25 g de amostra de sedimento e transferidos para frascos de *erlenmeyers* contendo 225 ml de solução de NaCl 0,85%. Os frascos permaneceram sob agitação magnética por 30 minutos. Decorridos 15 minutos após esse processo, do sedimento já precipitado, foram retirados 10 mL do sobrenadante e transferidos para *erlenmeyer* contendo meio *Bushnell-Haas*, acrescidos de 2% (v/v) de querosene previamente esterilizado por filtração em membranas de 0,22 µm (Millipore). Os frascos também foram incubados em estufa orbital tipo *Shaker* a 30°C com agitação de 150 rpm por 72 horas.

Isolamento Bacteriano

Após o período de incubação, foram retiradas alíquotas dos meios de cultivo para estriamento em placas de Petri contendo Ágar Triptona Soja – TSA (BBL). As placas permaneceram incubadas por 24 horas a 35°C e após esse período foram isoladas colônias com morfologias diferentes para a caracterização morfológica, através da técnica de coloração de Gram.

Avaliação do Potencial Biotecnológico das Cepas Bacterianas

Atividade Hemolítica

A produção de biossurfactantes está relacionada com a capacidade das bactérias quebrarem as células vermelhas do sangue. Esta avaliação foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Carrilo *et al.* (1996). As cepas bacterianas, após 24h de crescimento, foram inoculadas em placas de Petri com ágar

sangue contendo 5% (v/v) de sangue de carneiro desfibrilado. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. A atividade hemolítica é evidenciada através da formação de zonas de hemólise ao redor das colônias.

Produção de Biosurfactantes

A metodologia do processo de produção de biosurfactantes foi realizada de acordo com Lima e Silva *et al.*, (2010). As cepas com 24 horas de crescimento em ágar TSA foram inoculadas em meio Lúria Bertani - LB (Difco) e incubadas por 16 horas a 35°C para obtenção de um crescimento celular. Após esse período, foi transferido 1mL do crescimento bacteriano para *erlenmeyers* com meio LB acrescido de 2% (v/v) de querosene. Os frascos foram incubados em agitação magnética por 72 horas a 30 °C. Em seguida foi realizada a separação da biomassa por centrifugação do meio de cultura a uma velocidade de 1890 x g por 20 minutos a 10 °C, com posterior esterilização em membranas filtrantes de 0,22 µm (Millipore). Foi realizada medição do pH das fermentações após as 72 horas de agitação e do sobrenadante das culturas bacterianas (LM) usando fitas de medição de pH (Macherey – Nagel).

Teste do Colapso da Gota

A produção de biosurfactantes pelos isolados foi avaliada através do teste do colapso da gota descrito por Bodour e Miller–Maier (1998). Este teste foi realizado com o meio de cultivo após as 72 horas de crescimento (meio com células bacterianas) e após a centrifugação (meio isento de células). Em uma placa contendo 96 poços foi dispensado 10 µL de óleo lubrificante (Castrol®10W20) e deixados em repouso por 24 horas. Na placa untada foram dispensadas alíquotas de 10 µl dos meios de cultivo (antes e após a centrifugação), em triplicata. Após 1 minuto, o espalhamento da gota sobre a superfície oleosa foi considerado como resultado positivo, indicando a produção de biosurfactantes. Foi utilizada água Milli-Q como controle negativo.

Volume de Emulsificação e Estabilidade da Emulsão

O volume de emulsificação foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Das *et al.* (1998). Foram utilizados querosene comercial e n-hexadecano (SIGMA) como compostos hidrofóbicos no teste. Em tubos com tampa de rosca foram adicionados 2 mL do líquido metabólito das cepas e 2 mL dos compostos hidrofóbicos testados, em triplicata. Os frascos foram agitados por dois minutos e após isso foram mantidos em repouso pelo mesmo período de tempo. A altura da emulsão formada foi medida, após os 2 minutos de espera e após 24 horas, para a determinação do Volume de Emulsificação. A estabilidade das emulsões foi calculada através da fórmula descrita por Fennema (1985). Foram realizadas medições até 168 horas após o início do experimento. O surfactante sintético Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) foi utilizado como controle positivo no teste na concentração de 1 g L⁻¹. Na determinação do volume de emulsificação foram consideradas boas emulsões aquelas que apresentaram volumes de emulsão acima de 40% (Bosch *et al.*,1988).

Atividade de Emulsificação

A atividade de emulsificação foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Cirigliano e Carman (1984). Em tubos com tampa de rosca foram adicionados, em triplicata, 2 mL do sobrenadante (LM), 2 mL de tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 3) e 1 mL de n-hexadecano. Os tubos foram agitados por 2 minutos e deixados à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura espectrofotométrica da emulsão formada a um comprimento de onda de 540 nm. O resultado final foi calculado multiplicando-se a absorvância lida por 2 (fator de correção para a diluição feita com acetato de sódio, 1:1), expresso em Unidades de Atividade de Emulsificação (U.A.E). Foi utilizado uma amostra como “branco” contendo 2 mL de meio de cultura LB acrescido de tampão de acetato e n-hexadecano. Uma solução de SDS (1 g L⁻¹) foi usada como controle positivo no teste. Uma U.A.E. corresponde a quantidade de emulsificante capaz de formar uma emulsão com absorvância de 1,0 num comprimento de 540 nm (Cirigliano e Carman, 1984).

Tratamento Estatístico

A estatística descritiva foi utilizada para apresentação dos resultados dos testes que caracterizam a produção de biosurfactantes. O teste não paramétrico de *Mann Whitney* foi aplicado para verificar se houve diferença significativa entre os compostos hidrofóbicos testados (querosene e n-hexadecano) na determinação do volume de emulsificação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 22 cepas bacterianas, sendo 14 provenientes de amostras de água e 8 de sedimento. Vinte cepas foram caracterizadas como bastonetes Gram negativos e duas Gram positivas. Das 22 cepas isoladas, oito obtiveram resultado positivo no teste do colapso da gota, indicando forte atividade em ambos os meios (com e sem células bacterianas). A caracterização morfotintorial das cepas e os resultados dos testes do colapso da gota, atividade hemolítica e atividade de emulsificação estão apresentados na tabela 1.

A determinação da atividade hemolítica é considerada etapa inicial na seleção de microrganismos produtores de biosurfactantes (Carrilo *et al.*, 1996). Das 22 cepas bacterianas testadas, 14 apresentaram halos de hemólise, sendo 7 cepas beta-hemolíticas e 7 alfa-hemolíticas. Sete cepas não apresentaram atividade no teste, indicado pela gama-hemólise.

Esse teste leva em consideração o crescimento de bactérias usando hemoglobina como fonte de ferro (Schultz, 2010). Os eritrócitos humanos são destruídos por proteases extracelulares produzidas pelas bactérias (Bueno, 2008). A atividade hemolítica de alguns biosurfactantes pode estar associada à propriedade anfifílica desses compostos (Lin, 1996). Segundo Bicca *et al.* (1999), o teste hemolítico é rápido e pode ajudar a selecionar os microrganismos produtores de biosurfactantes.

Pode-se observar na tabela 1 que todas as cepas que demonstraram forte atividade no teste do colapso da gota foram isoladas das amostras de água. Esse teste foi realizado com o meio de cultivo após as 72 horas de biodegradação e com o sobrenadante (LM) para verificar se o biosurfactante produzido

permaneceu aderido à parede celular ou foi excretado como produto extracelular (Portilla-Rivera *et al.*, 2008; Pinto *et al.*, 2009). Nenhuma cepa isolada das amostras de sedimento apresentou boa atividade no teste. Viramontes-Ramos *et al.* (2010) isolaram mais de 300 cepas bacterianas de solo contaminado por hidrocarboneto. Dessas, apenas 17 apresentaram resultado positivo frente ao teste do colapso da gota. Safary *et al.* (2010) estudaram a capacidade de microrganismos em produzir biossurfactantes utilizando o teste do colapso da gota, atividade hemolítica e teste de deslocamento do óleo. As cepas isoladas na presente pesquisa, produtoras de biossurfactantes, apresentaram bons resultados em todos os testes, comprovando que o teste do colapso da gota quando usado em conjunto com os demais testes realizados é eficiente na prospecção de microrganismos produtores de compostos tensoativos.

Tabela 1. Caracterização morfológica e resultados do colapso da gota e atividade de emulsificação dos isolados bacterianos obtidos neste estudo. (+ + +) Forte atividade; (+ +) moderada atividade; (+ - -) fraca atividade; (- - -) nenhuma atividade; N.D (Não determinado); * = resultado em U.A.E. do controle positivo (SDS 1 g L⁻¹)

Origem	Isolado	Gram	Atividade Hemolítica	Colapso da gota com células	Colapso da gota sem células	Atividade de emulsificação (U.A.E.)
Água	M1	-	beta	+ + +	+ + +	2,02 ± 0,10
Água	M2	-	beta	+ + +	+ + +	1,91 ± 0,70
Água	M3	+	beta	+ + +	+ + +	1,95 ± 0,28
Água	M4	-	gama	+ + +	+ + +	1,96 ± 0,09
Água	M5	-	alfa	+ + +	+ + +	2,07 ± 0,01
Água	M6	-	alfa	+ + +	+ + +	1,91 ± 0,23
Água	M7	-	alfa	+ + +	+ + +	1,90 ± 0,02
Água	M8	-	gama	- - -	+ - -	1,34 ± 0,53
Água	M9	-	alfa	- - -	- - -	1,97 ± 0,12
Água	M10	-	beta	+ - -	- - -	1,08 ± 0,23
Água	M11	-	alfa	+ + +	+ + +	0,76 ± 1,06
Água	M12	+	beta	- - -	+ - -	1,89 ± 0,12
Água	M13	-	alfa	- - -	+ - -	1,82 ± 0,21
Água	M14	-	beta	- - -	- - -	1,99 ± 0,06
Sedimento	M15	-	gama	- - -	- - -	0,32 ± 0,01
Sedimento	M16	-	beta	- - -	- - -	2,03 ± 0,10
Sedimento	M17	-	alfa	- - -	- - -	1,99 ± 0,07
Sedimento	M18	-	N.D	- - -	- - -	1,94 ± 0,06
Sedimento	M19	-	gama	- - -	- - -	1,89 ± 0,08
Sedimento	M20	-	gama	- - -	- - -	1,89 ± 0,01
Sedimento	M22	-	gama	+ - -	- - -	1,88 ± 0,08
Sedimento	M23	-	gama	- - -	- - -	1,87 ± 0,12
						2,14 ± 0,10*

Na determinação da atividade de emulsificação, 20 cepas apresentaram valores de U.A.E. acima de uma unidade com máximo de 2,07 para a cepa M5 e mínimo de 1,08 para a cepa M10. Com esse teste é possível realizar uma avaliação qualitativa da emulsão formada. De acordo com a tabela 1, sete cepas apresentaram U.A.E. acima de 1,95, enquanto três apresentaram valores acima de 2,0. Um valor elevado de U.A.E. indica uma emulsão mais compacta com micelas menores e de melhor qualidade. Por outro lado, baixos valores de U.A.E. estão relacionados com emulsões que apresentam agregados maiores e menos compactas, portanto, de menor qualidade (Bento *et al.*, 2008). Estes agregados moleculares são formados quando o meio atinge uma concentração crítica do surfactante (CMC) e a sua forma (esférica, bicamada,

etc.) está relacionada também com o tipo de surfactante presente no meio (Rodrigues *et al.*, 2010). Os resultados desse teste indicam que mais de 50% dos isolados produziram emulsão com boa qualidade. Apenas duas cepas produziram emulsões com valores de U.A.E. abaixo de 1. As oito cepas que apresentaram resultado positivo no teste do colapso da gota também produziram U.A.E. acima de 1,90, com exceção da cepa M11 que apresentou uma U.A.E. de 0,76. Essa cepa não foi capaz de produzir boa emulsão mesmo apresentando resultado positivo no teste do colapso da gota. Deve-se considerar que esses testes avaliam qualidades diferentes dos compostos. Nas emulsões existem biossurfactantes com propriedades estabilizantes (emulsificantes) e também desestabilizantes (desemulsificantes) explicando a detecção de elevada capacidade tensoativa em culturas bacterianas, mas com formação de emulsões comparativamente menos estáveis (Chen *et al.*, 2007). Essa característica é típica de biossurfactantes de baixo peso molecular que, geralmente, são glicolípideos e lipopeptídeos (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos no teste de atividade de emulsificação foram semelhantes ao encontrado por Thavasi *et al.* (2011) para *Pseudomonas aeruginosa* (1,95 U.A.E) e *Bacillus subtilis* (entre 2 e 2,9 U.A.E) isolados de área portuária da Índia. De acordo com Pacwa-Plociniczak *et al.* (2011), biossurfactantes de baixa massa molecular reduzem a tensão superficial da água, porém não produzem boas emulsões. Por outro lado, biossurfactantes de alto peso molecular são bons agentes emulsificantes, mas não são eficientes em reduzir a tensão superficial. Possivelmente as cepas com fraca atividade no teste do colapso da gota, mas que obtiveram elevadas U.A.E. na presente pesquisa produziram metabólitos com propriedade bioemulsificantes.

Os resultados referentes à determinação do Volume de Emulsificação estão expressos na figura 1. No teste utilizando o querosene como composto hidrofóbico, das 22 cepas isoladas, 12 apresentaram volumes de emulsão acima de 40% com máximo de 82% para a cepa M1 e mínimo de 56% para a cepa M15. Na determinação do volume de emulsificação utilizando n-hexadecano, 12 cepas também apresentaram valores de emulsão acima do valor de referência (40%) após 24 horas, com máximo de 88% para a cepa M1 e mínimo de 58% para a cepa M23. Em relação ao teste estatístico realizado, como o valor-p foi de 0,4950, pode-se afirmar que não houve diferença significativa entre o querosene e o n-hexadecano utilizados como compostos hidrofóbicos na determinação do volume de emulsificação.

De acordo com os resultados da figura 1, pode-se verificar que mais de 50% dos isolados (12 cepas) produziram volumes de emulsificação acima de 40% em ambos os hidrocarbonetos testados. A cepa M9 produziu volumes de emulsão de 38% e 70% na determinação com querosene e n-hexadecano, respectivamente. Em contrapartida, a cepa M15 produziu um volume de emulsão com querosene de 56% e 9% com n-hexadecano.

Entre as cepas que apresentaram resultados positivos no teste do colapso da gota (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M11), como pode ser observado na tabela 1, apenas sete produziram boas emulsões. A cepa M11 apesar de ter desempenho positivo no teste do colapso da gota não produziu emulsão com nenhum dos hidrocarbonetos testados. Kim (2014) obteve valores de emulsão de 76,2% para n-hexadecano e 57,6% para querosene utilizando o biossurfactante produzido por uma cepa identificada como *Bacillus pumilus*. Na presente pesquisa, os isolados também produziram maiores valores de emulsão com crescimento em n-hexadecano como substrato. Entretanto, os dois compostos hidrofóbicos testados apresentaram resul-

tados estatisticamente iguais no teste ($p > 0,05$). Apesar dos resultados de volume de emulsificação serem estatisticamente iguais entre os dois compostos hidrofóbicos testados, observou-se que os maiores valores de emulsão encontrados foram obtidos utilizando o n-hexadecano como composto hidrofóbico. Isso pode estar relacionado com o fato do n-hexadecano ser um composto mais simples, enquanto o querosene é uma mistura de diferentes tipos de hidrocarbonetos. Em um estudo desenvolvido por Pereira et al., (2013) foi testada a produção de biossurfactantes pela bactéria *Bacillus subtilis* usando diferentes fontes de carbono, dentre elas o n-hexadecano. Os autores verificaram que não houve crescimento bacteriano no meio de cultivo contendo esse hidrocarboneto como única fonte de carbono. Priya e Usharani (2009), ao compararem a produção de biossurfactantes por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* utilizando óleos vegetais e hidrocarbonetos, dentre eles o querosene, observaram que os melhores valores de emulsão encontrados para esse hidrocarboneto foram de 52% e 55% para os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, respectivamente.

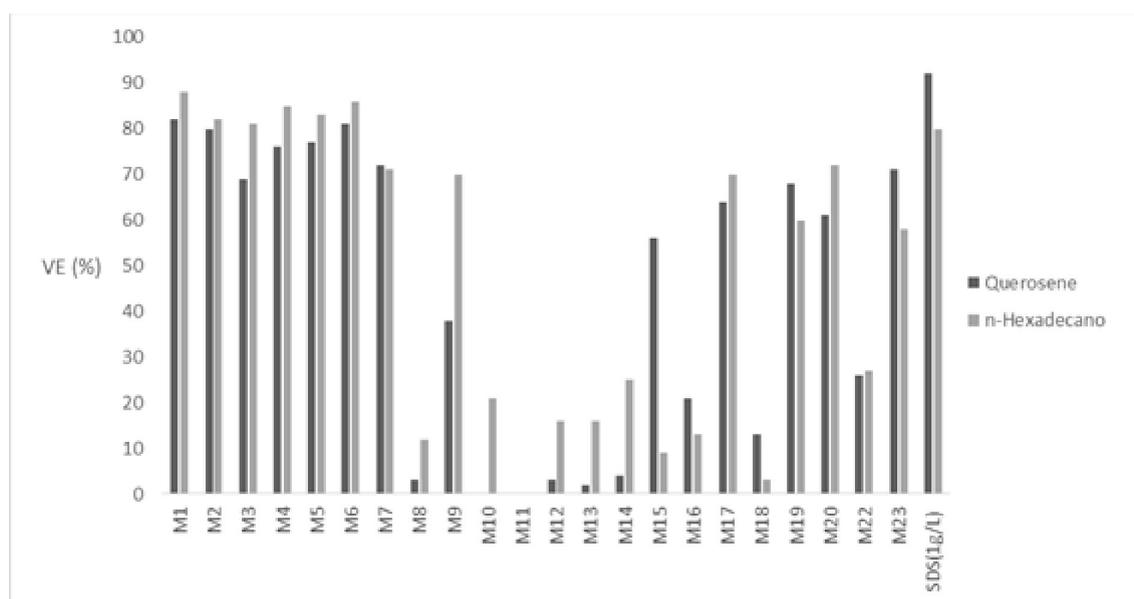


Figura 1. Resultados do Volume de Emulsificação (VE) das cepas isoladas do Porto do Mucuripe.

Os resultados da determinação das estabilidades estão apresentados na tabela 2. De acordo com Willumsen e Karlson (1997), emulsões que após 24 horas de formadas, mantém mais de 50% do seu volume original são consideradas estáveis. Pode-se verificar que até 168 horas de observação 63% dos isolados produziram emulsões estáveis na determinação com o querosene. Para o n-hexadecano apenas 50% dos isolados apresentaram essa capacidade. Este resultado pode indicar que a determinação do volume de emulsificação com o querosene tende a formar emulsões mais estáveis por um maior período de tempo. A cepa M10 não produziu emulsão na determinação do volume de emulsificação com querosene. Porém, na determinação com n-hexadecano, conseguiu produzir um baixo volume de emulsão (21%), mas com estabilidade de 58% ao fim das 168 horas, mostrando-se ainda assim promissora. A cepa M11 não produziu emulsão com nenhum dos hidrocarbonetos testados. As informações referentes ao volume de emulsificação e a estabilidade fornecem indícios quali-quantitativos dos biossurfactantes produzidos, onde aqueles que apresentaram melhores volumes e estabilidades são mais eficientes na solubilização de compostos imiscíveis, características dos tensoativos. A produção de emulsões e a capacidade de mantê-las estáveis

são características essenciais na prospecção de microrganismos produtores de biossurfactantes (Pinto *et al.*, 2009).

Viramontes-Ramos *et al.* (2010), ao estudarem o biossurfactante produzido por cepas isoladas de solo contaminado por hidrocarboneto, estimaram volumes de emulsificação entre 61 e 100% utilizando amido de milho, óleo de oliva, sacarose e parafina como fontes de carbono. De acordo com Lima e Silva *et al.* (2010), o processo de emulsificação depende da afinidade com os substratos utilizados para produzir o biossurfactante. Baseado nisso, as cepas que apresentaram bons volumes de emulsão nos testes realizados foram capazes de utilizar querosene no meio de cultivo como fontes de carbono durante o processo de biodegradação. Esse fato evidencia um potencial dos isolados em processos de remoção dessas substâncias no meio ambiente. Montagnolli *et al.* (2015) comprovaram que o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* promoveu um aumento nas taxas de biodegradação de óleo cru e querosene. Este fato salienta a importância dos biossurfactantes nos processos de biorremediação de hidrocarbonetos do ambiente, aumentando as taxas de biodegradação de poluentes por microrganismos. Geralmente essas substâncias tensoativas são produzidas por microrganismos heterotróficos usando hidrocarbonetos como substratos. Existe ainda pouca informação disponível sobre a produção de biossurfactantes por bactérias quimiolitotróficas (Sundaram e Thakur, 2015).

Tabela 2. Resultados da determinação da estabilidade das emulsões (%) produzidas pelos isolados bacterianos obtidos neste estudo.

Isolado	Estabilidade - Querosene (168 horas)	Estabilidade - n-hexadecano (168 horas)
M1	70	86
M2	72	88
M3	77	90
M4	97	87
M5	70	81
M6	72	87
M7	77	90
M8	5	11
M9	70	67
M10	0	58
M11	0	0
M12	7	32
M13	3	7
M14	4	9
M15	52	19
M16	4	44
M17	69	42
M18	4	8
M19	67	56
M20	96	45
M22	88	48
M23	92	64
SDS 1 g L ⁻¹	82	85

No presente estudo foi possível isolar cepas bacterianas que apresentaram volumes de emulsão e estabilidade superiores ao surfactante sintético testado. O SDS apresentou valor de U.A.E. de $2,14 \pm 0,1$ no teste de atividade de emulsificação e obteve um volume de emulsificação de 92%. Três cepas (M1, M5 e M16) apresentaram valores de U.A.E. próximo ao encontrado para esse surfactante. Quatro cepas (M4, M20, M22 e M23) produziram metabólitos com estabilidade superior ao SDS até 168 horas na determinação com querosene, quanto seis cepas (M1, M2, M3, M4, M6 e M7) apresentaram essa mesma capacidade para o n-hexadecano. Dentre essas cepas, a M4 apresentou estabilidade superior ao SDS nas duas determinações. Essa característica confere a essas cepas um elevado potencial biotecnológico, pois o biossurfactante produzido por esses microrganismos apresentou desempenho similar a um surfactante sintético amplamente utilizado em escala industrial, mostrando-se promissor. Batista *et al.* (2006), ao estudarem o biossurfactante produzido por cepas isoladas de áreas contaminadas por petróleo, obtiveram isolados que apresentaram estabilidade superior ao SDS até 48 horas de observação.

Áreas impactadas por hidrocarbonetos selecionam os microrganismos capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono (Santos *et al.*, 2010). Provavelmente, as cepas produtoras de biossurfactantes, na presente pesquisa, já estariam adaptadas à fração de hidrocarbonetos presentes na área do Porto do Mucuripe, visto que no local há o transporte de granéis líquidos constituídos, majoritariamente, por derivados de petróleo (Giacobo *et al.*, 2012). De acordo com a literatura, os biossurfactantes podem ser produzidos a partir de diferentes substratos, incluindo hidrocarbonetos (Rufino *et al.*, 2014).

CONCLUSÕES

Conclui-se que foi possível produzir compostos biossurfactantes a partir de querosene comercial. Os resultados do teste do colapso da gota, atividade hemolítica, atividade e volume de emulsificação indicaram que as cepas testadas são capazes de produzir metabólitos com propriedades tensoativas e emulsificantes. Mais de 50% dos isolados foram capazes de formar emulsões com boa qualidade e mantê-las estáveis por até 168 horas, evidenciando um elevado potencial biotecnológico. Nove isolados bacterianos produziram emulsões com estabilidade superior ao surfactante sintético SDS sendo oito Gram negativas (M1, M2, M4, M6, M7, M20, M22, M23) e apenas uma Gram positiva (M3) atestando que esses microrganismos apresentam potencial para serem utilizadas como base em processos de biorremediação de compostos hidrocarbonados, reduzindo os impactos ambientais provenientes de derramamentos de petróleo e/ou derivados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da pesquisa, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Iniciação Científica e ao Instituto de Ciências do Mar por disponibilizar a infraestrutura necessária para realização dos experimentos.

REFERÊNCIAS

- BATISTA, S.B. et al. 2006. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**, **97**:868-875.
- BALBA, M.T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. 1998. Bioremediation of oil contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal of Microbiological Methods**, **32(2)**:155-164.
- BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; GAYLARDE, C. C. 2008. Biossurfactantes. In: I. S. Melo; J. L. Azevedo (Ed.). **Microbiologia ambiental**, 2. ed. Jaguariúna: Embrapa, p. 151-184.
- BICCA, F. C.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of Biosurfactant by Hydrocarbon Degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, **30(8)**:231-236, 1999.
- BODOUR, A. A.; MILLER-MAIER, R. M. 1998. Application of a modified drop collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, **32(3)**:273-280.
- BOSCH, M. P. et al. 1988. Surface-active compounds on microbial cultures. **Tenside Surfactants Detergents**, **25**:208-211.
- BUENO, S. M. 2008. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Ribeirão Preto, 89f.
- CARRILO, P. G. et al. 1996. **World Journal of Microbiological and Biotechnology**, **12(1)**:82-84.
- CASTIGLIONI, G. L.; BERTOLIN, T. E. ; COSTA, J. A.V. 2009. Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, **32(2)**:292-295.
- CHEN, C. Y.; BAKER, S. C.; DARTON, R. C. 2007. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. **Journal of Microbiological Methods**, **70(3)**:503-510.
- CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, **48(4)**:747-750.
- DAS, M.; DAS, S. K.; MUKHERJEE, R. K. 1998. Surface active properties of the culture filtrates of a *Micrococcus* species grown on n-alkanes and sugars. **Bioresource Technology**, **63(3)**:231-235.
- FENNEMA, O. R. 1985. **Food Chemistry**. 2. ed. New York: Food Science and Technology, 991p.
- FONTES, G.C. et al. 2012. Renewable resources for biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, **29(3)**:483-493.
- GIACOBO, F. et al. Pesquisas e estudos para a logística portuária e desenvolvimento de instrumentos de apoio ao planejamento portuário: plano de mestre - Porto do Mucuripe. Disponível em: <<http://www.portosdobrasil.gov.br/assuntos-1/pnpl/arquivos/planos-mestres-versao-completa/plano-mestre-do-porto-do-mucuripe-versao-final.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2015.
- KIM, J. 2014. Isolation and Characterization of a Biosurfactant – producing Bacterium *Bacillus pumilus* IJ-1 from Contaminated Crud Oil Collected in Teaken, Korea. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, **57**:5-14.
- LIMA, E. et al. 2010. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milhocina como substrato. **Exacta**, **8(1)**:19-26.
- LIN, S. C. 1996. Biosurfactants: Recent Advances. **Journal Chemistry Technology and Biotechnology**, **66**:109-120.
- MAHJOUBI, M. et al. 2013. Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites in Tunisia: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. **New Biotechnology**, **30(6)**:723-733.
- MARTI, M. E. et al. 2015. Production of fatty-acyl-glutamate biosurfactant by *Bacillus subtilis* on soybean co-prod-

ucts. **Biochemical Engineering Journal**, **95**:48-55.

MONTAGNOLLI, R. N.; MATOS LOPES, P. R.; BIDOIA, E. D. 2015. Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. **Environmental Monitoring and Assessment**, **187**(1):4116.

MOREIRA, L. B. 2013. **Avaliação de risco ecológico da contaminação de sedimentos e material dragado na região do porto do Mucuripe – Ceará através de métodos ecotoxicológicos**. Tese (Doutorado em Ciências Marinhas Tropicais) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 153p.

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

PACWA-PLOCINICZAK, M. et al. 2011. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, **12**:633-654.

PEREIRA, J.F.B. et al. 2013. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Fuel**, **111**:259-268.

PINTO, M. H.; MARTINS, R. G.; COSTA, J. A. V. 2009. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Química Nova**, **32**(8):2104-2108.

PORTILLA-RIVERA, O. et al. 2008. Stability and Emulsifying Capacity of Biosurfactants Obtained from Lignocelulosic Sources Using *Lactobacillus pentosus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **56**:8074-8080.

PRIYA, T.; USHARANI, G. 2009. Comparative Study for Biosurfactant Production by Using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Botany Research International**, **2**(4):284-287.

RODRIGUES, G. D.; SILVA, L. H. M.; SILVA, M. C. H. 2010. Alternativas verdes para o preparo de amostra e determinação de poluentes fenólicos em água. **Química Nova**, **33**(6):1370-1378.

RUFINO, R. D. et al. 2014. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolitica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, **17**:34-38.

SAFARY, A. et al. 2010. Isolation and Characterization of Biosurfactant Producing Bacteria from Caspian Sea. **Biotechnology**, **9**(3):378-382.

SCHULTZ, F. M. 2010. **Avaliação de microrganismos com potencial de degradação de diesel e biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 113f.

SANTOS, S. et al. 2010. Evaluation of substrates from renewable-resources in biosurfactants production by *Pseudomonas* strains. **African Journal of Biotechnology**, **9**(35):5704-5711.

SUNDARAM, S.; THAKUR, I. S. 2015. Biosurfactant production by a CO₂ sequestering *Bacillus* sp. strain ISTS2. **Bioresource Technology**, **188**:247-250.

THAVASI, R.; SHARMA, S.; JAYALAKSHMI, S. 2011. Evaluation of screening methods for the isolation biosurfactant producing marine bacteria. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, S1-001:1-6.

VIRAMONTES-RAMOS, S. et al. 2010 Selection of biosurfactan/bioemulsifier-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, **41**:668-675.

TONINI, R. M. C.; REZENDE, C. E.; GRATIVO, A. D. 2010. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, **14**(4):1010-1020.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. 1997. Screening of bacteria, isolated from PAH- contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, **7**(5):415-423.