



Bioprospecção de microrganismos produtores de biossurfactantes

Bioprospecting of biosurfactant-producing microorganisms

Fernanda Fachinello¹, Thiago Cintra Maniglia²

RESUMO

Biossurfactantes são produtos microbianos que possuem a função de diminuir a tensão superficial entre moléculas, bem como de solubilização, emulsificação, dispersão, ação detergente e estabilização. São vantajosos em relação aos surfactantes químicos, pois apresentam baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, permanecendo fortemente ativos mesmo em condições extremas de salinidade e pH. Visou-se realizar a bioprospecção de microrganismos produtores de biossurfactantes a partir de solo contaminado com óleo de motor automotivo. Para tal, 14 isolados do meio MSM-óleo, 5 isolados do meio PIA e 10 isolados do meio MSM-glicose foram selecionados aleatoriamente e testados para produção de biossurfactante em 4 ensaios: teste da gota, de espalhamento de óleo, de CTAB Ágar e de emulsificação. A partir disso, foram selecionados os 4 isolados mais promissores (SC-MO15, SC-P8, SC-MG13 e SC-MG15). Por fim, foram identificados molecularmente 3 dos 4 microrganismos promissores, sendo que o isolado SC-MO15, caracterizado como uma bactéria da espécie *Acinetobacter junii*, se destacou na produção de biossurfactante.

PALAVRAS-CHAVE: biodegradabilidade, bio-sustentabilidade, emulsificação, metabólitos, micelas.

ABSTRACT

Biosurfactants are microbial products that have the function of reducing surface tension between molecules, as well as solubilization, emulsification, dispersion, detergent action and stabilization. They are advantageous in comparison to chemical surfactants because of their low toxicity and high biodegradability, remaining strongly active even in extreme salinity and pH conditions. The goal of this study was to bioprospect for biosurfactant-producing microorganisms from soil contaminated with automotive engine oil. To this end, 14 isolates from the MSM-oil medium, 5 isolates from the PIA medium and 10 isolates from the MSM-glucose medium were randomly selected and tested for biosurfactant production in 4 assays: drop test, oil spreading test, CTAB Agar test and emulsification test. From this, the 4 most promising isolates were selected (SC-MO15, SC-P8, SC-MG13 and SC-MG15). Finally, 3 out of the 4 promising microorganisms were molecularly identified, with the isolate SC-MO15, characterized as a bacterium of the *Acinetobacter junii* species, standing out in the production of biosurfactant.

KEYWORDS: biodegradability, bio-sustainability, emulsification, metabolites, micelles.

INTRODUÇÃO

Biossurfactantes são compostos ativos produzidos por microrganismos com função de diminuir a tensão superficial entre moléculas, bem como de solubilização, emulsificação, dispersão, ação detergente e de estabilização. Os biossurfactantes são produzidos como metabólitos secundários que permanecem aderidos à superfície dos microrganismos ou são secretados para fora das células (JAHAN *et al.*, 2020). Atualmente, correspondem a cerca de 10% da produção mundial de surfactantes, ou seja, aproximadamente 10 milhões de toneladas por ano (SARUBBO *et al.*, 2022), demonstrando a relevância da produção de biossurfactantes nos dias atuais.

¹ Bolsista da Fundação Araucária. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: ffachinello@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 9849998720408043.

² Docente no Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: thiagomaniglia@utfpr.edu.br. ID Lattes: 6369955002305436.

O funcionamento dos biossurfactantes ocorre pela formação de micelas, existindo uma concentração específica definida como a mínima concentração de biossurfactante requerida para atingir a menor tensão superficial (*Critical Micelle Concentration - CMC*). Nesse ponto, as moléculas se reúnem por meio da união das porções hidrofóbicas na parte interior (“caudas”) e as porções hidrofílicas para fora, as “cabeças” (SARUBBO *et al.*, 2022). Um menor CMC é vantajoso para um surfactante químico ou biossurfactante pois após esse ponto a adição de mais surfactante não impactará na redução da tensão superficial. Assim, quanto menor o CMC, menor será a quantidade a ser utilizada da molécula biossurfactante para que se atinja o mínimo de tensão superficial. A forma de produção dos surfactantes sintéticos é amplamente vista como insustentável e contrária aos objetivos de desenvolvimento sustentável das Nações Unidas (SARUBBO *et al.*, 2022).

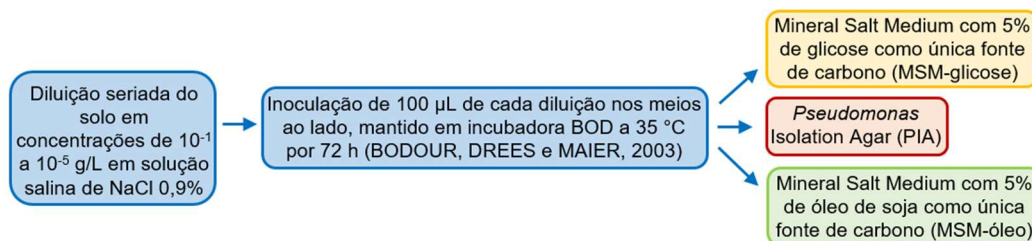
O estudo em questão é justificado pelas principais vantagens dos biossurfactantes em relação aos surfactantes químicos que, além da sua biodegradabilidade, são a sua maior atividade superficial e interfacial (por possuírem menor CMC), a baixa toxicidade (mais apropriado para uso nas indústrias alimentícia e de cosméticos, por exemplo), a estabilidade em força iônica alta (são estáveis em concentrações salinas de até 10% m/v, enquanto que os surfactantes sintéticos em apenas 2 a 3% m/v) e, ainda, há a possibilidade de utilização de substratos alternativos na produção por via fermentativa, como os resíduos agroindustriais (FELIPE e DIAS, 2017). O principal desafio na substituição do uso de surfactantes sintéticos pelos biossurfactantes é o seu custo elevado de produção em relação ao anterior.

O presente trabalho teve como principal objetivo realizar bioprospecção a partir de solo contaminado com óleo de motor automotivo a fim de encontrar microrganismos que fossem capazes de produzir biossurfactantes. Além disso, visou-se realizar a identificação molecular destes microrganismos.

METODOLOGIA

Após estudos preliminares de bioprospecção de microrganismos produtores de biossurfactantes a partir de latossolo vermelho de rizosfera, percebeu-se que os isolados mais promissores haviam sido selecionados a partir do meio de cultivo que continha óleo de soja como a única fonte de carbono. Dessa forma, visou-se realizar a bioprospecção de microrganismos produtores de biossurfactantes a partir de latossolo vermelho do tipo argiloso (ROCHA, NÓBREGA e CUNHA, 2022) contaminado com óleo de motor automotivo de uma oficina mecânica da cidade de Toledo – PR, visto que foi uma das fontes de solo contaminado com óleo mais facilmente disponíveis na cidade de realização do estudo. O processo de inoculação dos microrganismos presente no solo contaminado (SC) com óleo de motor automotivo pode ser observado no fluxograma dado na Figura 1.

Figura 1 – Processo de inoculação dos microrganismos presentes no solo contaminado com óleo.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

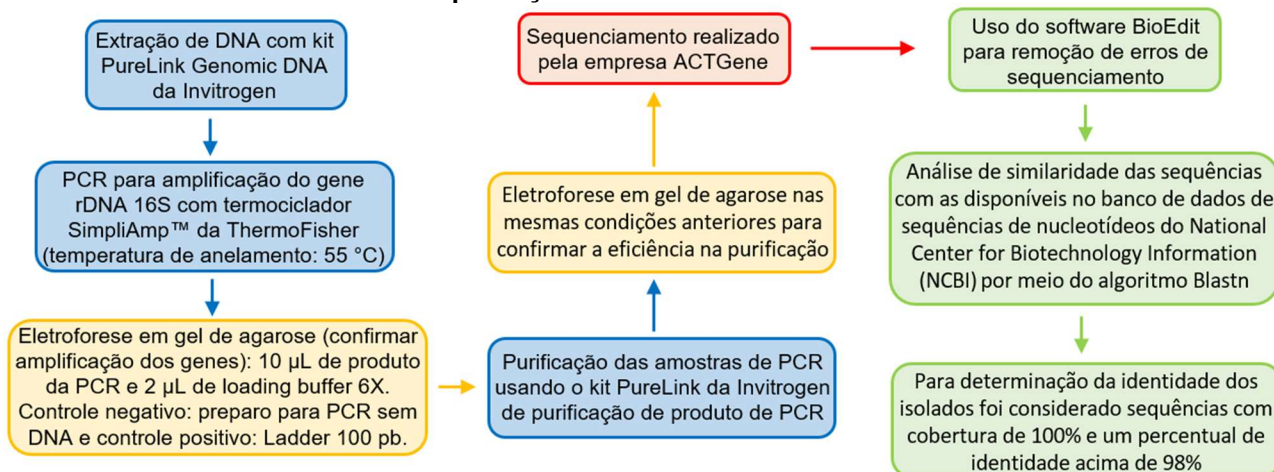


Já para realizar o isolamento das distintas colônias que cresceram em cada placa, foram consideradas características morfológicas, observadas macroscopicamente e microscopicamente, que distinguíssem as colônias, como coloração, transparência, tamanho, aparência da superfície, forma e morfologia celular. O isolamento das colônias foi feito a partir da técnica de estriamento simples nos respectivos meios em que foram cultivadas anteriormente, sendo as placas, mantidas em incubadora BOD a 37 °C por cerca de 24 h. Para realização dos testes de produção de biossurfactantes, 14 isolados do meio MSM-óleo, 5 isolados do meio PIA e 10 isolados do meio MSM-glicose foram selecionados aleatoriamente e colocados para crescimento em caldo Luria Bertani (LB) em shaker a 35 °C e 200 rpm, por cerca de 24 h.

Após o isolamento dos microrganismos, eles foram inoculados no caldo Bushnell e Haas (BHM) em shaker a 30 °C e 140 rpm por 7 dias para posterior realização de testes para verificar o potencial de produção de biossurfactante dos isolados (RANI, WEADGE e JABAJI, 2020). Passados os 7 dias, as amostras foram centrifugadas a 4 °C e 6500 rpm por 20 minutos para serem filtradas, com o auxílio de seringas, em filtros millipore 0.22 µm. O primeiro ensaio foi o teste da gota, no qual 6 µL das amostras filtradas eram adicionados em poços de uma placa de poliestireno, a qual continha 3 µL de óleo de soja que havia secado em estufa a 22 °C por 24 h. O segundo teste foi o de espalhamento de óleo, que compreendeu a pipetagem de 10 µL dos filtrados sobre 20 µL de óleo de soja em placas contendo 20 mL de água destilada. Já no terceiro teste, o de CTAB Ágar, foram inseridos 150 µL dos filtrados em poços de placas de Petri contendo meio CTAB (brometo de cetrimônio), sendo estas incubadas em BOD a 37 °C por 48 h.

Por fim, o quarto teste, de emulsificação, consistiu na adição de 5 mL do tampão Tris 50 mM (pH 8) em um tubo de ensaio, 10 µL de óleo de soja e 1 mL dos filtrados. Os tubos foram passados no vortex por 1 minuto e deixados em repouso por 20 minutos. Após isso, foi medida a absorbância da mistura emulsificada de cada amostra em Espectrofotômetro FEMTO 600 Plus a 610 nm. Os controles positivo e negativo, para todos os testes foram, respectivamente, o surfactante químico Tween 80 e o caldo BHM não inoculado. Já o processo de identificação molecular, realizado para os microrganismos que obtiveram melhor desempenho nos testes de produção de biossurfactante, é apresentado no fluxograma presente na Figura 2.

Figura 2 – Processo de identificação molecular dos isolados com melhor desempenho nos testes de produção de biossurfactantes.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

De um total de 49 isolados, foram selecionados aleatoriamente para testagem para produção de biossurfactantes 14 isolados do meio MSM-óleo, 5 isolados do meio PIA e 10 isolados do meio MSM-glicose. Quando feitas as análises macroscópica e microscópica, percebeu-se que todos os isolados se tratavam de bactérias devido ao aspecto das colônias, formato e tamanho celular. Em relação aos testes, para o ensaio da gota, notou-se que todos os potenciais biossurfactantes ficavam com aspecto arredondado ao entrarem em contato com o óleo de soja nos poços da placa, enquanto que o controle positivo (Tween 80) se espalhava no poço. Assim, considerou-se que todas as amostras obtiveram resultado negativo para esse teste. Já para o segundo teste, de espalhamento de óleo, foi averiguada a capacidade do potencial biossurfactante espalhar o óleo de soja que se encontrava por cima da água destilada. Houve filtrados que espalhavam o óleo todas as vezes que era repetido o teste, sendo esses as amostras SC-MO15, SC-MG15 e SC-P8, e outras amostras espalhavam o óleo algumas das vezes, sendo elas SC-MG5, SC-MG9, SC-MG11 e SC-MG13 (Figura 3).

Figura 3 - Amostras positivas (1), amostras negativas (2) e controle negativo (3) para o teste de espalhamento de óleo (verificação de produção de biossurfactante).



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

No teste de CTAB Ágar, mais uma vez, nenhum dos potenciais biossurfactantes obteve resultado positivo. No entanto, isso não descarta a possibilidade de que as amostras sejam de biossurfactantes, visto que esse ensaio avalia apenas a presença de biossurfactantes aniônicos, os quais reagiriam com o CTAB, que é um surfactante catiônico, formando um halo azul ao redor do poço (RANI, WEADGE e JABAJI, 2020). Por fim, para o último teste, o de emulsificação, obteve-se os resultados observados na Tabela 1. As amostras que não se encontram na tabela foram muito próximas de 0 de absorbância ou muito menores que a absorbância do controle positivo (Tween 80).

Tabela 1 – Absorbâncias a 610 nm no teste de emulsificação (avaliar presença de biossurfactantes).

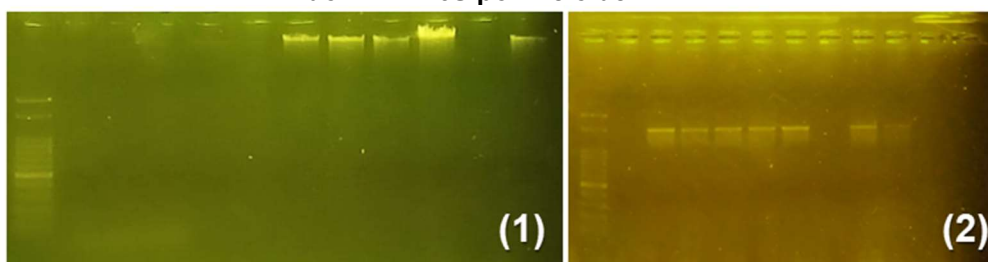
Amostra	Absorbância
Controle positivo	0,542
SC-MO15	0,530
SC-P8	0,369
SC-MG13	0,412
SC-MG15	0,199

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Considerando os testes realizados, foi observado que a amostra SC-MO15 foi a melhor na produção de biossurfactantes, seguida pelas amostras SC-P8, SC-MG13 e SC-MG15, visto que obtiveram resultados próximos ao do controle positivo no teste de emulsificação e, ainda, dissolveram o óleo no teste de espalhamento na maioria das vezes.

A respeito da identificação molecular dos isolados com melhor desempenho nos testes de produção de biossurfactantes, a extração de DNA por meio da utilização do kit PureLink Genomic DNA da Invitrogen, bem como posteriores amplificação do gene rDNA 16S e purificação foram bem sucedidas, como pode ser observado nas eletroforeses em gel de agarose realizadas (Figura 4).

Figura 4 - Eletroforeses para confirmação de (1) extração de DNA das amostras e (2) amplificação do rDNA 16S por meio de PCR.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Após o retorno dos resultados de sequenciamento, análise destes com o software BioEdit e utilização do banco de dados de nucleotídeos do NCBI, obteve-se que o isolado SC-MO15, aquele com melhor perfil de produção de biossurfactantes, possui 99,45% de similaridade com *Acinetobacter junii*. Esse resultado demonstra-se coerente, visto que Ohadi *et al.* (2017) realizou o isolamento, caracterização e otimização de biossurfactante produzido por *A. junii*.

Ao analisar o sequenciamento do isolado SC-MG13, observou-se que se tratavam de dois microrganismos distintos, devido ao alto nível de ruído, presença de picos duplicados e bases não identificadas no sequenciamento. Assim, foi realizado um novo isolamento e obteve-se dois isolados diferentes, os quais foram testados para a produção de biossurfactantes, com apenas um dos microrganismos possuindo resultados satisfatórios nos testes de espalhamento e de emulsificação, com valores próximos dos encontrados nas primeiras testagens. Para esse isolado, foi novamente realizada a identificação molecular com base no rDNA 16S e a sequência obtida apresentou 99,43% de similaridade com *Priestia megaterium* e com *Priestia aryabhatai*.

Para o isolado SC-MG15, obteve-se 99,35% de similaridade com *Bacillus subtilis*. Essa espécie se trata de uma das mais encontradas na literatura em relação à produção de biossurfactantes, como proposto por Gudiña *et al.* (2015), corroborando com seu potencial de produtor deste bioproduto. Por fim, não foi possível realizar a extração de DNA, PCR, purificação e sequenciamento do isolado SC-P8.

CONCLUSÕES

Diante do exposto, conclui-se que foi possível encontrar espécies de microrganismos promissoras para a produção de biossurfactantes na bioprospecção de solo contaminado com óleo de motor automotivo, tal qual o isolado SC-MO15, identificado como uma bactéria

da espécie *Acinetobacter junii*. Os próximos passos incluem realizar a otimização da produção e caracterização dos biossurfactantes produzidos por esses isolados, realizando ensaios bioquímicos que explicitem qual o melhor deles dentre os obtidos.

Agradecimentos

Agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Toledo, por ceder o espaço e recursos para realização desta pesquisa, especialmente ao Laboratório de Biotecnologia de Microrganismos (LaBiM) e Laboratório Multiusuário Central Analítica (LABCA). Ainda, agradeço à Fundação Araucária que viabilizou recursos na forma de bolsa de iniciação científica para que a realização do presente trabalho se tornasse possível.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

- BODOUR, A. A.; DREES, K. P.; MAIER, R. M. Distribution of Biosurfactant-Producing Bacteria in Undisturbed and Contaminated Arid Southwestern Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 69, n° 6, p. 3280–3287, jun. 2003.
- FELIPE, L. de O.; DIAS, S de C. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes: vantagens e desvantagens. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 39, n° 3, p. 228-236, ago. 2017.
- GUDIÑA, E. J. *et al.* Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, p. 1-7, fev. 2015.
- JAHAN, R. *et al.* Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdã, v. 275, 102061, jan. 2020.
- OHADI, M. *et al.* Isolation, characterization, and optimization of biosurfactant production by an oil-degrading *Acinetobacter junii* B6 isolated from an Iranian oil excavation site. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Amsterdã, v. 12, p. 1-9, out. 2017.
- RANI, M.; WEADGE, J. T.; JABAJI, S. Isolation and Characterization of Biosurfactant-Producing Bacteria From Oil Well Batteries With Antimicrobial Activities Against Food-Borne and Plant Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 11, fev. 2020.
- ROCHA, A. S.; NÓBREGA, M. T.; CUNHA, J. E. Caracterização físico-hídrico-químico de Latossolo Vermelho sob sistema de plantio direto no Oeste do Paraná. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, Santa Cruz do Sul, v. 13, n. 2, p. 14-27, fev. 2022.
- SARUBBO, L. A. *et al.* Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdã, v. 181, 108277, abr. 2022.