

## **INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, FONTE DE CARBONO E DE pH NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES E BIOMASSA POR *GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* UCP 986.**

A. L. N. Gondim

Curso Superior de Tecnologia Ambiental - CEFET-CE  
Rua Tibúrcio Pereira, nº 251, Quadra 9, Bloco 9, Apto.102, Bairro Cajazeiras, CEP: 60864-260, Fortaleza-CE  
E-mail – amandalais\_ng@hotmail.com

M. C. F. Paz

Gerência de Química e Meio Ambiente do CEFET-CE – Pesquisadora DCR/FUNCAP/CNPq  
Rua João Melo, nº 729, Bloco A, Apto. 501, Bairro Damas, CEP: 60426-050, Fortaleza-CE  
E-mail: mabelfranca@yahoo.com.br

### **RESUMO**

Os estudos com microrganismos, principalmente com bactérias termofílicas, têm despertado um grande interesse na área ambiental, por serem capazes de produzir substâncias que apresentam função de degradar, ou favorecer a degradação de compostos complexos na natureza como os hidrocarbonetos. Essas substâncias são chamadas de biossurfactantes, pois são produzidas por bactérias e fungos como resultado de seu metabolismo. Um dos microrganismos estudados para esse fim, pertence à família Bacillaceae, do gênero *Geobacillus*. A espécie *Geobacillus stearothermophilus* é o foco desse estudo por ser um microrganismo capaz de crescer em ambientes variados com valores extremos de temperatura, pH e salinidade e produzirem biomoléculas com estabilidade. Os biossurfactantes são substâncias importantes nos processos de biorremediação de resíduos industriais, pelo potencial biotecnológico de degradação de substâncias recalcitrantes. Por saber da habilidade na produção de biopolímeros e o potencial biotecnológico do *Geobacillus stearothermophilus*, decidiu-se estudar essa bactéria para avaliar o efeito da temperatura e glicose na produção de biossurfactantes; correlacionando a produção de biomassa com a fonte de carbono; observando possíveis alterações macroscópicas e microscópicas na morfologia célula e produção de endósporos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Geobacillus stearothermophilus*, Biorremediação, Compostos Complexos, Biossurfactantes.

## 1. INTRODUÇÃO

A contaminação dos diversos ambientes, principalmente da água, vem crescendo cada vez mais, tornando escassa a água de boa qualidade. Essa contaminação se dá pela introdução de substâncias nocivas que acarreta vários efeitos negativos sobre a vida animal e vegetal. O homem é o maior causador dos desequilíbrios ambientais, pois é devido às atividades antrópicas que ele polui o meio ambiente, lançando diretamente na água, poluentes perigosos sem tratamento prévio. Além disso, habituou-se a tratar a água como um bem inesgotável na natureza, onde o desperdício é enorme e os recursos finitos.

A poluição por petróleo e seus derivados vem crescendo consideravelmente nos últimos anos e é uma consequência inevitável, pois é acarretado pelo enorme volume que este recurso energético é transportado e produzido anualmente. Por ter um caráter hidrofóbico, o petróleo se espalha sobre a superfície da água, formando uma película que impede a troca de gases entre a água e o ar, eliminando toda fauna e flora da superfície das águas contaminadas (Cunha & Guerra, 1999). Os compostos mais densos do petróleo, como os metais pesados, decantam e os tóxicos entram na cadeia alimentar, acumulando-se nos peixes, moluscos e caranguejos que entram na cadeia alimentar de um ecossistema.

Uma tentativa de minimizar esse problema é a utilização de surfactantes sintéticos, por serem substâncias anfipáticas que tendem a se localizar preferencialmente na interface entre fases fluidas, tais como interfases óleo-água ou gás-água, formando um filme molecular que reduz a tensão interfacial, sendo responsável pelas propriedades singulares das moléculas surfactantes (BANAT, 1995; SARUBBO, 1997; SARUBBO *et al.*, 2001). Esses surfactantes podem ser utilizados em diversos setores industriais que envolvem desde a ação de detergência à solubilização e dispersão de fases, podendo ainda ser utilizados pelas indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentos.

Diante disso, a biotecnologia surgiu com a proposta de utilizar microrganismos para o tratamento de águas contaminadas por petróleo, já que alguns deles, tais como bactérias e fungos leveduriformes conseguem produzir naturalmente, através de seu metabolismo esses surfactantes, que passaram a se chamar biosurfactantes. Essas substâncias conseguem degradar, ou favorecer a degradação de substratos insolúveis em água.

O uso de microrganismos termofílicos do gênero *Bacillus* apresenta-se importante nos processos de biorremediação de resíduos industriais, pelo potencial biotecnológico de degradação de substâncias recalcitrantes, além de serem considerados ubíquos na natureza (PAZ, 2005). Dentro da família *Bacillaceae* existem microrganismos capazes de proliferar em ambientes variados caracterizados por valores extremos de temperatura, salinidade e pH, que, inicialmente, seriam considerados inviáveis ao seu desenvolvimento. A capacidade de adaptação a estes ambientes extremos torna-os valiosos para o homem devido a sua ampla aplicação biotecnológica no tratamento de resíduos gerados por atividades antrópicas, principalmente industriais.

Extremófilos são microrganismos que se desenvolvem em ambientes adversos, e que têm despertado grandes interesses biotecnológicos, devido à expressão de suas enzimas que possuem alta estabilidade termodinâmica e mostram-se inativas em temperaturas amenas, como as mesofílicas (GIUFFRÈ *et al.*, 1999). As enzimas produzidas em condições de extremofilia ou termoeestáveis são versáteis e importantes para uma variedade de indústrias que apresentam resíduos de sua atividade, compostos recalcitrantes, detergentes, indústria do açúcar, petroquímica, entre outros (FUJIWARA, 2002).

*Geobacillus* é um novo gênero pertencente à família *Bacillaceae*, pode ser explorado biotecnologicamente por apresentar características extremamente interessantes, como termofilia e halofilia. O que aumenta o interesse por este microrganismo na produção de biopolímeros tão importante como os biosurfactantes, em condições adversas para os demais microrganismos estudados até então. Os microrganismos do gênero *Geobacillus* apresentam a habilidade de degradar hidrocarbonetos, devido à presença de um grupo de enzimas como a monooxigenase alcanos, fazendo com que o microrganismo se apodere do composto.

A capacidade de adaptação dos microrganismos a ambientes sob condições extremas, torna-os valiosos para o homem devido a sua ampla aplicação biotecnológica no tratamento de resíduos gerados por atividades antrópicas, principalmente industriais. Desta forma, este trabalho busca observar a influência de diversos fatores tais como temperatura, fonte de carbono e pH para a produção de biosurfactantes e biomassa.

## 2 OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo, estudar a influência da temperatura, da fonte de carbono e de pH para a produção de biossurfactantes e de biomassa por uma nova amostra de *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986, a partir das seguintes etapas:

- a) Avaliar o efeito da temperatura e glicose na atividade de emulsificação em condições de termofilia moderada;
- b) Correlacionar a produção de biomassa com a fonte de carbono em condições de termofilia moderada e diferentes pHs;
- c) Observar possíveis alterações macroscópicas e microscópicas na morfologia célula e produção de endósporos;

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O microrganismo utilizado é uma bactéria isolada do solo do Porto do Recife contaminado por resíduos de petróleo e encontra-se depositado no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais NPCIAMB – UNICAP - PE, identificados e codificados (UCP). A amostra de *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986 foi repicada para meio Brain Heart Infusion Broth (DIFCO) em temperaturas de 45°, 50° e 55°C por um período de 24 horas. Foi observado o crescimento das colônias em Ágar Nutriente (DIFCO), nas diferentes temperaturas para observação do aspecto morfológico.

**Meio de cultura e condições de cultivo:** *Geobacillus stearothermophilus* foi crescido em frascos Erlenmeyers de 250mL de capacidade com 150mL do meio Luria Bertani (LB), segundo Konishi *et al* (1997). O cultivo foi realizado por um período de 48 horas, em agitação orbital (160rpm) a temperaturas diferentes (50° e 55°). O crescimento foi medido por turbidez espectrofotômetro a 660nm. O inóculo correspondeu a  $10^7$  células/mL, numa densidade óptica ( $D_{660}$ ) de 0.8. Após o tempo de cultivo de 48 horas, as amostras foram submetidas a centrifugação de 2500 x g por 15 min a 10°C, para separação das células do líquido metabólico.

**a) Índice de emulsificação:** foi utilizado o líquido metabólico livre de células para determinar o índice de emulsificação pelo método descrito por Cooper & Goldenberg (1984). Para determinação do índice de emulsificação (IE), foram utilizados 2mL de líquido metabólico e 1mL de n-hexadecano, homogeneizado em vórtex por 2 minutos, a 25°C. Após este tempo, a leitura foi realizada através de medição da altura da emulsão formada. O índice é calculado através da equação: Índice da Emulsão (%) =  $He \times 100 / Ht$ , onde He = altura da emulsão; Ht = altura total do líquido.

**b) Atividade de emulsificação:** foi realizada utilizando o líquido metabólico, onde as bactérias cresceram em meio Luria Bertani (LB) contendo 1%, 2%, 5% e 10% de glicose, como fonte de carbono, sobre agitação de 150 rpm, 50° e 55 °C por 72 horas de incubação, em duplicata. Como controle foi utilizado o meio LB contendo 5mg/L de glicose (Konishi et al., 1997). A atividade de emulsificação no líquido metabólico livre de células foi determinada pelo método de CIRIGLIANO & CARMAN (1984).

**c) Proteínas extracelulares:** foi analisado conteúdo protéico extracelular do líquido metabólico livre de células, onde ocorreu crescimento bacteriano na presença de glicose, diferentes temperaturas e pH, em variadas concentrações através do kit de Proteínas Totais (LABTEST).

**d) Consumo de glicose:** o consumo de glicose no líquido metabólico livre de células foi determinado através do método colorimétrico (LABTEST - Diagnostic - Brasil) e medido espectrofotometricamente a 505nm.

**e) pH:** o pH do líquido metabólico livre de células foi medido em pHmetro MICRONAL, ao longo da fermentação.

#### 4. RESULTADOS

Tabela 1 Valores médios de pH, temperatura (°C), biomassa (g), índice de emulsificação (%) e atividade de emulsificação (U.A. E) nos diferentes condições de cultivo do *G.stearothermophilus* UCP 986.

Glicose (%)	Temperatura (° C)	pH		Biomassa (g)	Índice de emulsificação (%)	Atividade de emulsificação U.A. E (540nm)
		inicial	final			
1%	50	8.14	9.31	0.28090	28.57	5,90
	55	6.12	6.64	0.36920	8.57	5,26
2%	50	8.14	3.88	0.29970	11.11	4,48
	55	6.15	3.82	0.70040	8.57	3,14
	50	8.40	9.15	0.40730	55.55	5,16
	55	6.41	6.79	0.42550	22.85	3,43
5%	50	8.40	3.70	0.29810	22.22	1,86
	55	6.40	3.70	0.38890	0.00	1,09
10%	50	8.32	4.19	0.68460	14.29	0,98
	55	6.30	4.26	0.40470	20.00	0,96
Controle	50°	8.32	4.20	0.04300	14.29	1,05
		6.32	4.31	0.41560	17.14	3,08

A tabela 1 apresenta os resultados referentes à avaliação da atividade de emulsificação, teste qualitativo, índice de emulsificação, teste quantitativo onde se evidencia que o microrganismo em estudo possui caráter de produtor de substância emulsificante. Estudos mostram que microrganismos Gram-positivos produtores de biosurfactantes são considerados excelentes na remoção de íons metálicos, em ambientes aquáticos e terrestres (BODOUR *et al.*, 2003). O índice de emulsificação da amostra de *G. stearothermophilus* (TABELA 1) considerado um teste quantitativo, apresentou comportamento linear e satisfatório. O biopolímero avaliado com atividade de emulsificação, produzido pelo microrganismo *Geobacillus stearothermophilus*, é provavelmente, da classe dos lipopetídeos e lipoproteínas, como sugere Sarubbo *et al.*, (2001); Nitschke & Pastore (2002) e Urum *et al.*, (2004).

A produção do biosurfactante e o crescimento do microrganismo foram estudados com o meio de cultura Luria Bertani, suplementado com glicose. Na tabela 1 observa-se que o substrato foi totalmente consumido no período de 8 horas, quando então o microrganismo apresentou o fenômeno de diauxia e após 24 horas, entrou em sua fase estacionária. A curva de pH mostra que ocorreu um leve decréscimo do pH de 8,32 para 3,70 com 8 horas de cultivo durante a fase exponencial, e foi mantido praticamente o mesmo até o final da fermentação.

#### 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A temperatura é um fator de grande influência sobre o crescimento bacteriano quando associado à velocidade das reações metabólicas dos microrganismos. Isso se deve ao fato de que tais reações são catalisadas por enzimas específicas e desta forma, aumentam ou diminuem a atividade enzimática de acordo com a temperatura. As bactérias do gênero *Bacillus* apresentam um elevado potencial biotecnológico com relação à produção de enzimas como as proteases, entre outras, que são utilizadas em escala industrial.

A característica de extremófilos dos microrganismos é considerada uma “chave” no tratamento de alguns tipos de resíduos industriais recalcitrantes, pois se sabe que na termofilia as enzimas destes microrganismos são produzidas rapidamente devido à aceleração que ocorre na velocidade das reações bioquímicas, que em geral são afetadas por fatores externos como pH, temperatura, pressão osmótica, etc.

Os microrganismos do gênero *Geobacillus* apresentam a habilidade de degradar hidrocarbonetos de forma efetiva, produzindo biopolímeros, pretende-se neste trabalho, modificar as condições de produção deste biopolímero e avaliar o produto formado quanto à estabilidade, viabilidade econômica e científica.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Logan, N. A.; Peter C. B.; Turnbull. *Bacillus* and Recently Derived Genera. **Manual of Clinical of Microbiology**. 7<sup>th</sup>, New York, 745p.1998.

Marchi, D. D. ; Carvalho, D. F.; Durrant, L. R. **Produção de Biossurfactantes Bacterianos em Óleos Vegetais e Derivados de Petróleo**. DCA/FEA-UNICAMP, 1998.

Nitschke, M., Pastore, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química. Nova**, 2002 - [Acesso na web](#) em 13.07.06

Paz, M.C.F., **Identificação e Caracterização de *Bacillus licheniformis* e *Geobacillus stearothermophilus*. /Produção de Biossurfactantes e Degradação de Dibenzotiofeno (DBT) – por uma Nova Amostra de *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986**. Universidade Federal de Pernambuco Doutorado em Ciências Biológicas. Recife – Pe, 2005.

Sneath, P.H.A. Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** Section 13.1104-1137p.1986.

Queiroga C. L.; Nascimento, L.R; Serra, G E,. Evaluation of Paraffins Biodegradation and Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* in the Presence of Crude Oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 34:321-324.2003.

A **poluição por petróleo** e derivados é uma consequência inevitável do enorme volume... A **poluição** petrolífera **acarreta** sérios problemas para a vida marinha,. [www.sosterravida.hpg.ig.com.br/poluicao](http://www.sosterravida.hpg.ig.com.br/poluicao). acesso em 16.10.06  
**8.**