



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE**  
**E BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE**



**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR  
MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS E EPIFÍTICOS DE MACRÓFITAS  
AQUÁTICAS COLETADAS EM AFLUENTES DO RIO NEGRO CONTAMINADOS  
POR PETRÓLEO**

**JOÃO MARCELO SILVA LIMA**

**MANAUS - AM**  
**2016**

**JOÃO MARCELO SILVA LIMA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR  
MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS E EPIFÍTICOS DE MACRÓFITAS  
AQUÁTICAS COLETADAS EM AFLUENTES DO RIO NEGRO CONTAMINADOS  
POR PETRÓLEO**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE/Universidade Federal do Amazonas - UFAM/Universidade Estadual do Amazonas - UEA, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia

Orientador: Dr. João Lúcio de Azevedo

Co-orientadores: Dr. José Odair Pereira  
Dra. Ieda Hortêncio Batista  
Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto

**MANAUS - AM  
2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Lima, João Marcelo Silva

L732a Avaliação do potencial de produção de biossurfactantes por micro-organismos endofíticos e epifíticos de macrófitas aquáticas coletadas em afluentes do rio Negro contaminados por petróleo / João Marcelo Silva Lima. 2016

102 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Dr. João Lúcio Azevedo

Orientador: Dr. José Odair Pereira Coorientador: Dr.

Pedro de Queiroz Costa Neto Coorientador: Dra. Ieda

Hortêncio Batista

Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas/Universidade Estadual do Amazonas.

1. *Microbacterium* sp. (Bactéria). 2. *Phoma* sp. (Fungo). 3. Biorremediação . 4. Caracterização química. 5. Bioemulsificante. I. Azevedo, Dr. João Lúcio II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**JOÃO MARCELO SILVA LIMA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR  
MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS E EPIFÍTICOS DE MACRÓFITAS  
AQUÁTICAS COLETADAS EM AFLUENTES DO RIO NEGRO CONTAMINADOS  
POR PETRÓLEO**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE/Universidade Federal do Amazonas - UFAM/Universidade Estadual do Amazonas - UEA, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Co-orientadores: Dr. José Odair Pereira  
Dra. Ieda Hortêncio Batista  
Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto

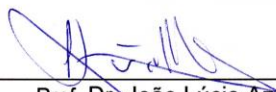
**JOÃO MARCELO SILVA LIMA**

"AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BIODISSURFACTANTES POR MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS E EPIFÍTICOS DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS COLETADAS EM AFLUENTES DO RIO NEGRO CONTAMINADOS POR PETRÓLEO."

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: **Prof. Dr. João Lúcio Azevedo**  
Co-orientadora: **Dr. José Odair Pereira e Dra. Ieda Hortêncio Batista e Dr. Pedro Queiroz Costa Neto**

**Banca examinadora:**



Prof. Dr. João Lúcio Azevedo  
Orientador – Presidente da banca



Dr. Carlos Cleomir de Souza Pinheiro  
Membro



Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza  
Membro



Dra. Cristina Sayuri Maki  
Membro



Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio  
Membro

MANAUS – AMAZONAS  
Junho/2016

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que lutam por um mundo melhor, sem poluição, sem preconceito e discriminação de qualquer natureza.

## **AGRADECIMENTOS**

À criação da Rede em Biodiversidade e Biotecnologia – BIONORTE pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado.

À Secretaria de Educação SEDUC/SEMED pela liberação das atividades de sala de aula para desenvolver este trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo, fundamental para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. João Lúcio de Azevedo por ter aceitado o pedido de orientação e pela ajuda na organização dos artigos e incentivo para a realização deste Projeto.

Ao Prof. José Odair, pela amizade e incentivo no desenvolvimento do trabalho e pelas ótimas dicas na organização e elaboração dos artigos e por ter organizado um laboratório quase do nada para abrigar inicialmente a mim e à colega Jucileuza ou Juci.

À Profa. Ieda Hortêncio, que sempre está à disposição para ajudar no que for preciso, e pelas excelentes contribuições para a organização das ideias no trabalho.

À Profa. Antonia Sousa, pelo incentivo para fazer o curso de Doutorado e pelas ótimas dicas fornecidas para a produção dos biossurfactantes.

Ao Prof. Pedro Costa Neto, pela ajuda nas correções do trabalho e contribuição, assim como pela fundamental ajuda na identificação molecular dos fungos, meu muito obrigado.

Ao bolsista Mozanil Pantoja, pela ajuda no processo de extração de DNA dos fungos e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Adolfo Mota, pela contribuição na identificação molecular das bactérias.

Ao Prof. MS.c. Raimundo Junior, pelas análises realizadas ao apagar das luzes do CBA, muito grato.

Ao Dr. Carlos Cleomir, pelo auxílio na evaporação das amostras e dicas na interpretação dos espectros.

À banca examinadora pelas correções e sugestões.

A todos os colegas do Curso pelos bons momentos que passamos.

E a todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

## **EPÍGRAFE**

### **Tecendo a Manhã**

1

Um galo sozinho não tece a manhã: ele precisará sempre de outros galos.

De um que apanhe esse grito que ele e o lance a outro; de outro galo que apanhe o grito que um galo antes e o lance a outro; e de outros galos que com muitos outros galos se cruzam os fios de sol de seus gritos de galo para que a manhã, desde uma tela tênue, se vá tecendo, entre todos os galos.

2

E se encorpando em tela, entre todos e se erguendo tenda, onde entre todos, se entretendendo para todos, no toldo (a manhã) que plana livre de armação.

A manhã, toldo de um tecido tão aéreo que, tecido, se eleva por si: luz balão"

**João Cabral de Melo**



## RESUMO

Os biossurfactantes são compostos produzidos por fungos e bactérias em diferentes condições ambientais e comportamentais e podem ser usados como alternativa para a biorremediação de ambientes contaminados por petróleo e seus derivados. A seleção de fungos e bactérias endofíticas e epifíticas, com provável atividade biossurfactante, foi realizada por meio dos seguintes testes: biodegradabilidade, utilizando descoloração do 2,6 Dicloro Fenol Indofenol (DCPIP); colapso da gota de petróleo; emulsificação, avaliação da tensão superficial pelo método do anel de Du Nouÿ, e curva de produção dos microorganismos mais promissores. Amostras fúngicas em um total de oito mostraram-se eficientes no teste de biodegradabilidade, pois promoveram a descoloração do indofenol em 24 e 48h, estas foram identificadas como: S31 *Phoma* sp., S36 *Phoma* sp., S24 *Rhizopus oryzae*, S46 *Fusarium* sp., S42 *Fusarium* sp., S32 *Fusarium* sp., S33 *Fusarium* sp. e S51 *Fusarium* sp. Destes, o isolado S31 *Phoma* sp. apresentou emulsão do diesel de 1,5 cm ou 52% com redução da tensão superficial da água de 72,43 mN/m para 51,03 mN/m, além disso, os oito fungos selecionados apresentaram atividade na produção de enzimas: lacase, pectinase, amilase e lipase. Dentre as bactérias, o isolado M87 *Microbacterium* sp., mostrou melhor correlação entre os testes realizados. Esse isolado produziu 3,0 g/L de biossurfactantes e suas frações promoveram a redução da tensão superficial da água abaixo de 40 mN/m. A melhor fração (F<sub>1</sub>) foi analisada por FT-IR infravermelho, UFLC-MS e RMN <sup>1</sup>H. As diferentes técnicas mostraram a presença de compostos provavelmente relacionados a ácidos graxos, um tipo de biossurfactante não iônico que pode ser explorado futuramente na indústria de cosméticos ou como emulsificante em processos de biorremediação. O teste para avaliar a citotoxicidade do extrato liofilizado e aquoso da bactéria, e o de toxicidade do extrato aquoso do fungo, não mostraram atividade tóxica. Novos estudos fazem-se necessários no sentido de promover o crescimento dessas culturas, puras ou em consórcio; utilizando diferentes fontes de carbono com o intuito de identificar a melhor fonte para a produção de biossurfactantes, assim como aprofundar os estudos de caracterização química dos diferentes biossurfactantes e bioemulsificantes produzidos, tanto pelo fungo como pela bactéria selecionada.

Palavras-Chave: *Microbacterium* sp 2. *Phoma* sp. 3. Biorremediação 4. Caracterização química 5. Bioemulsificante

## ABSTRACT

Biosurfactants are compounds produced by fungi and bacteria in different behavioral and environmental conditions, and can be used as an option for the bioremediation of environments contaminated by oil and its derivatives. The selection of fungi, endophytic and epiphytic bacteria, with potential biosurfactant activity, was evaluated through the following tests: Biodegradability using discoloration of 2,6 Dichloro Phenol Indophenol (DCPIP); oil drop-collapse; and emulsification, through surface tension evaluation with Du Nouy ring and the resulting production curve of the most promising microorganisms. Eight fungal samples were effective in the biodegradability test, since they promoted discoloration of indophenol in 24 and 48 hours: S31 *Phoma* sp, S36 *Phoma* sp, S24 *Rhizopus oryzae*, S46 *Fusarium* sp., S42 *Fusarium* sp., S32 *Fusarium* sp, S33 *Fusarium* sp. and S51 *Fusarium* sp. All of these fungal isolates produced laccase, pectinase, amylase and lipase. Of these, the S31 *Phoma* sp. isolate presented a diesel emulsion of 1.5 cm, or 52%, to reduce water surface tension from 72.43 mN/m to 51.03 mN/m. Among the bacteria selected, the M87 *Microbacterium* sp. isolate presented the best correlation between the tests. This isolate produced 3.0 g/L of biosurfactants, and the fractions promoted reduction of water surface tension below 40 mN/m. The best fraction (F1) was analyzed through FT-IR infrared UFLC-MS and <sup>1</sup>H NMR which demonstrated the presence of compounds probably related to fatty acids, a type of non-ionic biosurfactant, that could be used in the cosmetic industry or as an emulsifier in bioremediation processes. No toxic activity was detected either in the bacterial lyophilized aqueous extract or the fungal aqueous extract. Further studies are required in order to: Promote the growth of these, pure or consortium, cultures; identify the best carbon source for the production of biosurfactants; and perform a more thorough chemical characterization of the different biosurfactants and bioemulsifiers from the fungi and bacteria selected.

Key words: 1. *Microbacterium* sp, 2 *Phoma* sp. 3. Bioremediation 4. Chemical characterization 5. Bioemulsifier.

Key words: 1. *Microbacterium* sp, 2 *Phoma* sp. 3. Bioremediation 4. Chemical characterization 5. Bioemulsificante.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica de um surfactante.....	20
Figura 2. Concentração micelar crítica de biossurfactantes .....	23
Figura 3. <i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms (Pontederiaceae).....	33
Figura 4. <i>Cyperus ligularis</i> L. (Cyperaceae) .....	34
Figura 5. <i>Ichnanthus calvescens</i> Döll (Poaceae).....	35
Figura 6. Crescimento de fungos filamentosos em meio BH + petróleo. Como controle, foi utilizado o meio BH + petróleo, sem o fungo .....	59
Figura 7. Amostras de fungos filamentosos em placa multipoços de poliestireno, contendo (1) indofenol, petróleo e sem o fungo, (2-11) indofenol, petróleo e fungos, (12) controle com indofenol sem o petróleo, sem o fungo. Observar a descoloração do indofenol nas amostras de 2-11.....	61
Figura 8. Aspecto do perfil eletroforético da purificação do PCR. As bandas de rDNA numeradas de 1 a 8 correspondem aos isolados fúngicos.....	63
Figura 9. Teste do colapso da gota em placas de petri. Observar a dispersão da gota de petróleo em 0 na placa com o extrato do isolado (S31) quando comparado com o detergente comercial usando como controle positivo.....	65
Figura 10. Teste de emulsificação, utilizando petróleo e o extrato fúngico filtrado com membrana 0,45 µm. Observar a formação da coluna de emulsificação em (b, d), em 24h. como controle positivo utilizou-se SDS (a), controle negativo sem extrato fúngico (c)	67
Figura 11. Curva de produção de biossurfactante produzida pelo fungo epifítico <i>Phoma</i> sp. (S31) isolado de <i>Cyperus ligularis</i> L. no rio Negro – Amazonas/Brasil, ocorrendo em área contaminada com petróleo. ....	68
Figura 12. Análise de probit das seis concentrações utilizadas 100, 50, 25, 13, 7 e 3 µL do extrato fúngico <i>Phoma</i> sp. (S31) livre de células.....	69
Figura 13. Teste de seleção de micro-organismos produtores de biossurfactes utilizando-se o meio BH + petróleo e isolados bacterianos. Como controle foi utilizado meio BH + petróleo, sem os isolados. ....	71
Figura 14. Teste utilizando o 2,6 Diclorofenol indofenol. No tubo incolor mostra a ação da bactéria. O tubo com líquido em azul corresponde ao indofenol sem bactéria, utilizado como controle. ....	72
Figura 15. Teste do colapso da gota de petróleo para seleção de micro-organismos produtores de biossurfactantes.....	73

Figura 16. Curva de produção de biossurfactante pelo isolado M87 <i>Microbacterium</i> sp. ....	75
Figura 17. Curva de produção de biossurfactante do isolado SB43 <i>Escherichia</i> sp. ....	75
Figura 18. Extrato liofilizado produzido pelo isolado M87 <i>Microbacterium</i> sp.....	77
Figura 19. Placa cromatográfica da fração 1 evidenciando a presença de compostos orgânicos.....	78
Figura 20. Análise da fração 1 por meio do HPLC/MS, mostrando os principais picos correspondentes as substâncias presentes.....	80
Figura 21. Espectro de ressonância magnética com transformada de Fourier do biossurfactante produzido pela <i>Microbacterium</i> sp.....	81
Figura 22. Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do biossurfactante produzido.....	82
Figura 23. Teste de citotoxicidade do extrato bruto e liofilizado da bactéria <i>Microbacterium</i> sp. utilizando-se diferentes linhagens do fibroblasto humano.....	83
Figura 24. Representação gráfica dos fungos filamentosos na secreção de enzimas de interesse comercial .....	86
Figura 25. Representação das variáveis nos componentes 1 e 2 da ACP.....	87
Figura 26. Figura mostrando a proximidade entre os indivíduos.....	87
Figura 27. Representação dos indivíduos (amostras de fungos) no dendrogramo. ....	88
Figura 28. Aspecto dos halos de degradação das amostras frente a diferentes substratos: evidencia-se a ação da lacase, celulase, pectinase. ....	88

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura química de alguns surfactantes sintéticos .....	21
Tabela 2. Principais tipos de biossurfactantes e micro-organismos produtores .....	24
Tabela 3. Diferentes técnicas analíticas empregadas na elucidação de biossurfactantes	27
Tabela 4. Medida da atividade emulsificante .....	44
Tabela 5 Crescimento de amostras de fungos filamentosos em meio BH (Bushnell-Haas) + petróleo .....	60
Tabela 6. Testes de biodegradabilidade dos isolados, utilizando indofenol + petróleo ..	62
Tabela 7. Identificação molecular dos fungos endofíticos e epifíticos isolados de macrófitas do rio Negro- Amazonas/Brasil, com os respectivos códigos de depósito no NCBI (National Center for Biotechnology Information) .....	64
Tabela 8. Seleção de fungos endofíticos e epifíticos isolados de macrófitas do rio Negro – Amazonas/Brasil para produção de biossurfactantes por meio de diferentes parâmetros de avaliação. ....	66
Tabela 9. Seleção dos isolados bacterianos, utilizando indofenol + petróleo. ....	70
Tabela 10. Principais bactérias selecionadas como produtora de biossurfactantes. ....	73
Tabela 11. Análise da tensão superficial de diferentes frações obtidas do extrato do isolado M87 <i>Microbacterium</i> sp. ....	79
Tabela 12. Caracterização química do biossurfactante produzido pela bactéria <i>Microbacterium</i> sp.....	80
Tabela 13. Tensão superficial (mN/m) do extrato crescido em diferentes pHs e tempo de fermentação para a produção de biossurfactantes do isolado M87. ....	84
Tabela 14. Atividade enzimática dos isolados frente aos diferentes substratos enzimáticos .....	85

## SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA .....	
RESUMO .....	V
ABSTRACT .....	VI
LISTA DE FIGURAS .....	VII
LISTA DE TABELAS .....	IX
1. INTRODUÇÃO .....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	20
2.1 Surfactantes e biossurfactante: Definição e função .....	20
2.2 Classificação dos biossurfactantes e bioemulsificantes .....	23
2.3 Fatores que afetam a produção de biossurfactantes .....	24
2.4 Elucidação de estruturas de biossurfactantes .....	27
2.5. Desafio na produção de biossurfactantes de origem microbiana .....	28
2.6 Sociedade atual e a biorremediação .....	28
2.7 Petróleo e seus impactos .....	29
2.8 A biorremediação como alternativa para detoxificação do ambiente .....	30
2.9 Micro-organismos endofíticos, epifíticos, características, ação biodegradadora e potencial biotecnológico .....	31
2.10 Macrófitas aquáticas e micro-organismos associados .....	32
2.11 Enzimas e aplicações biotecnológicas .....	35
3 OBJETIVOS .....	38
3.1 Objetivo geral .....	38
3.2 Objetivos específicos .....	38

4. JUSTIFICATIVA .....	39
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
5.1 Amostras e material biológico.....	41
5.1.2 Identificação das espécies botânicas .....	41
5.1.3 Petróleo e diesel.....	41
5.2 SELEÇÃO PRELIMINAR DE MICRO-ORGANISMOS PARA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES .....	42
5.2.1 Reativação de micro-organismos.....	42
5.2.2 Seleção preliminar de micro-organismos para a produção de biossurfactantes ....	42
5.2.3 Processo de filtragem .....	43
5.3 TESTE DE BIODEGRADABILIDADE UTILIZANDO O INDICADOR REDOX 2,6-DICLOROFENOL INDOFENOL (DCPIP) .....	43
5.4 TESTE QUALITATIVO DO COLAPSO DA GOTA DE ÓLEO .....	43
5.5 Avaliação da atividade de emulsificação.....	44
5.6 PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR FUNGOS E BACTÉRIAS .....	45
5.6.1 Linhagens selecionadas para a produção de biossurfactante.....	45
5.6.2 Preparo do inóculo.....	45
5.6.3 Condições de cultivo para a produção de biossurfactante.....	45
5.6.4 Meio líquido base para a produção de biossurfactante e condições de cultivo ....	45
5.6.5 Curva de produção de biossurfactantes por fungos e bactérias .....	46
5.6.6 Avaliação da atividade emulsificante .....	46
5.6.7 Avaliação da tensão superficial .....	46
5.6.8 Avaliação do efeito do pH na produção de biossurfactantes pelo isolado bacteriano .....	47
5.7 CONDIÇÕES DE CULTIVO E ISOLAMENTO DO BIOSURFACTANTE BACTERIANO .....	47

5.7.1 Extração com clorofórmio: metanol .....	47
5.7.2 Detecção do biossurfactante em extrato bruto por Cromatografia em Camada Delgada.....	48
5.7.3 Purificação dos extratos e solamento dos biossurfactantes por meio de coluna cromatográfica .....	48
5.7.4 Redução da Tensão Superficial em relação aos surfactantes sintéticos comerciais .....	48
5.7.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS BIOSSURFACTANTES PRODUZIDOS POR <i>Microbacterium</i> sp.....	49
5.7.4.1 Espectroscopia no infravermelho (FT-IR).....	49
5.7.4.2 Cromatografia líquida acoplada a Espectrômetro de Massas (UFLC/MS) .....	49
5.7.4.3 Ressonância magnética nuclear (RMN <sup>1</sup> H) .....	49
5.8 TESTE DE CITOTOXICIDADE UTILIZANDO CÉLULAS PADRÃO .....	50
5.9 TESTE DE CITOXICIDADE UTILIZANDO <i>Artemia salina</i> .....	50
5.10 Metodologia utilizada para identificação molecular de fungos.....	51
5.10.1 Metodologia utilizada para amplificação das Regiões ITS1 e ITS4 .....	51
5.10.2 Metodologia utilizada para a purificação da PCR .....	52
5.10.3 Reação de Sequenciamento .....	52
5.10.4 Edição e alinhamento das sequências nucleotídicas.....	52
5.11 Identificação molecular de bactérias .....	53
5.11.1 Extração de DNA.....	53
5.11.2 Quantificação do DNA .....	53
5.11.3 Amplificação do DNA pela reação de PCR .....	54
5.11.4 Purificação do DNA amplificado .....	54
5.11.5 Reação de Sequenciamento .....	55
5.11.6 Edição e alinhamento das sequências nucleotídicas.....	55
5.12 SCREENING ENZIMÁTICO DOS ISOLADOS FÚNGICOS .....	55



5.12.1 Avaliação de atividade da lacase .....	56
5.12.2 Avaliação da atividade da amilase .....	56
5.12. 3 Avaliação da atividade de celulase .....	57
5.12.4 Avaliação da atividade da proteinase .....	57
5.12.5 Avaliação da atividade de pectinase .....	57
6.1 Avaliação de fungos filamentosos para a produção de biosurfactantes .....	58
6.1.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS FÚNGICOS.....	62
6.1.2 TESTE SELETIVO DO COLAPSO DA GOTA DE PETRÓLEO .....	64
6.2 SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFITICAS PARA A PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES .....	70
6.2.1 Curva de produção de biosurfactantes pelos isolados selecionados .....	74
6.3 PRODUÇÃO E ISOLAMENTO DE BIOSURFACTANTES PRODUZIDO PELA BACTÉRIA ENDOFÍTICA <i>Microbacterium</i> sp.....	76
6.7 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO . .....	79
6.4 TESTE DE CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS DA BACTÉRIA <i>Microbacterium</i> sp.....	83
6.5 EXPERIMENTO PARA DETERMINAR O MELHOR PH PARA A PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES DO GÊNERO <i>Microbacterium</i> SELECIONADO.....	83
6.6 PRODUÇÃO DE ENZIMA DE INTERESSE COMERCIAL POR FUNGOS FILAMENTOSOS.....	84
7. CONCLUSÃO.....	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	91
ANEXOS .....	

## 1. INTRODUÇÃO

As descobertas de petróleo na Amazônia, sua exploração e produção estão em franco processo de desenvolvimento, por outro lado, essas atividades geram problemas ambientais decorrentes de vazamentos e por vezes acidentes, envolvendo o derramamento de petróleo ou de seus derivados. O petróleo é um composto orgânico, formado por processos biogeoquímicos, constituído em sua maior parte por uma mistura complexa de hidrocarbonetos (TONINI, REZENDE, GRATIVOL, 2010)

A contaminação ambiental por esta substância e por seus derivados causa grande impacto ecológico e as técnicas para sua remediação têm recebido destaque nas últimas décadas. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) de origem petrogênica estão entre os poluentes de maior persistência, apresentando propriedades tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas aos seres humanos. A maior parte dos componentes do petróleo é passível de biodegradação, no entanto, trata-se de um processo lento, podendo levar décadas até a total descontaminação do ambiente (TONINI, REZENDE, GRATIVOL, 2010)

Para Pacheco (2008) a grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada quimicamente, a partir de derivados do petróleo. No entanto, sabe-se que muitos destes compostos apresentam alta toxicidade e baixa biodegradabilidade, necessitando de tratamento adicional após sua aplicação.

A pesquisa por biossurfactantes produzidos por micro-organismos é uma importante demanda por novos produtos de baixo impacto para o meio ambiente, uma vez que atende aos anseios por uma postura de responsabilidade em relação aos problemas ambientais causados pela poluição por meio de acidentes com derramamento, e diferentes utilidades do petróleo na sociedade atual.

Assim, técnicas de biorremediação, com utilização de biossurfactantes e bioemulsificantes têm sido alvo de diversos estudos, a fim de acelerar o processo de descontaminação com menor custo e menor dano ambiental (PACHECO, 2008; TONINI, REZENDE, GRATIVOL, 2010; OLIVEIRA, 2014).

Os biossurfactantes são compostos biológicos anfifílicos, contendo uma porção polar e outra apolar, o que lhes confere a habilidade de agir nas superfícies e interfaces, podem ser produzidos por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, e apresentam grande diferença dos surfactantes sintéticos pela variabilidade na sua natureza hidrofóbica e hidrofílica (DHARA, SACHDEV, CAMEOTRA, 2013; SOURAV et al., 2015).

Vários aspectos para a utilização de biossurfactantes são atraentes, pois consiste em um processo natural e é uma técnica que pode ser aplicada *in situ* com perturbação ambiental mínima, sendo muitas vezes mais baratas e mais seguras (DECESARO et al., 2013). A procura por espécies e variedades de micro-organismos, capazes de realizar biodegradação de poluentes e muitas vezes transformá-los em produtos úteis deve ser uma preocupação constante (AZEVEDO, 2008).

A Amazônia com potencial, ainda inexplorado, principalmente em relação aos micro-organismos, se faz necessário estudos de espécies de fungos ou bactérias produtoras de compostos anfifílicos para que possam ser utilizados na proteção ou biorremediação do bioma amazônico, onde a várzea e os rios são ambientes altamente sensíveis à poluição, sendo acumuladores naturais de resíduos poluentes.

O risco potencial de acidentes com petróleo e derivados tem-se agravado nos últimos anos na região Amazônica devido ao aumento da exploração e transporte, ocasionando danos ambientais às populações locais, pois essas notadamente utilizam a água e o solo para a subsistência alimentar. A pesquisa sobre biossurfactantes como processo de desenvolvimento na Amazônia, por meio da biotecnologia pode ser útil e necessária para a remediação dos diferentes ambientes impactados por hidrocarbonetos.

A pesquisa teve como principal objetivo avaliar a produção de biossurfactantes por fungos e bactérias endofíticas e epifíticas, isolados de macrófitas aquáticas, coletadas em áreas com histórico de contaminação por petróleo. As macrófitas aquáticas, neste contexto, são plantas que apresentam registro na literatura como indicadoras de poluição ambiental, pois são encontradas em ambientes impactados por petróleo ou seus derivados.

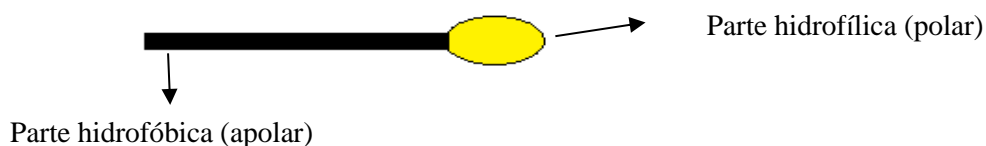
O trabalho ora realizado foi uma pequena contribuição, no muito que ainda é preciso conhecer sobre a produção de biossurfactantes e bioemulsificantes por fungos, bactérias e leveduras provenientes da região Amazônica. Por outro lado, a pesquisa realizada abre uma possibilidade de ampliar o conhecimento acerca de micro-organismos promissores na produção de compostos naturais anfifílicos, que futuramente podem ser utilizados em processos de produção em escala industrial, com aplicação em diferentes ambientes contaminados por petróleo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Surfactantes e biossurfactante: Definição e função

Surfactantes possuem uma parte hidrofílica (polar) e uma hidrofóbica (apolar) que tendem a separar interfaces como ar/óleo e água/óleo, atuando nas tensões superficiais e interfaciais, formando microemulsões (SOURAV et al., 2015).

Para Maniasso (2001) um surfactante típico possui uma estrutura do tipo R-X, onde R é o grupo apolar e X é o grupo polar (Figura 1). A parte hidrofóbica é uma cadeia de hidrocarbonetos variando de 8 a 18 átomos de carbono, sendo que a parte hidrofílica é quem determina se um surfactante é iônico, aniônico, catiônico ou anfótero. Desta forma, os grupos hidrofílicos podem conter sulfonato, sulfato, carboxilato (aniônicos), amônio quaternário (catiônico), ou polioxietileno (não iônico) (Tabela 1).



**Figura 1.** Estrutura básica de um surfactante

Os líquidos procuram uma forma que reduzam sua área de superfície, e formam-se uma rede de moléculas vizinhas semelhantes, ocasionando uma força atrativa entre suas vizinhanças. Este aumento das forças atrativas intermoleculares na superfície é chamado de tensão superficial (PIRÔLLO, 2006; BENTO, CAMARGO, GAYLARDE, 2008).

Pirôllo (2006) destacou que quando um surfactante é adicionado aos sistemas ar/água ou óleo/água, em concentrações crescentes, observa-se uma redução na tensão superficial até um valor crítico, a partir do qual as moléculas de surfactantes se associam formando estruturas supramoleculares como micelas (Figura 2) bicamadas e vesículas.

**Tabela 1.** Estrutura química de alguns surfactantes sintéticos

Surfactante	Agente tensoativo	Fórmula
Aniônico	Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4^- \text{Na}^+$
Catiônico	Brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}$
Não iônico	Polioxietileno (32) dodecanol (brij 35)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{23}\text{OH}$
Anfótero	4 - (dodecildimetil amônio) butirato (DAB)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_3\text{COO}^-$

Fonte: Maniasso (2001)

Os biossurfactantes são de origem biológica, produzidos por fungos, bactérias ou leveduras, e são conhecidos como Agentes Ativos em Superfície, do inglês **Surface Active Agents** e apresentam um caráter anfipático, pois possuem uma parte polar ou hidrofílica e apolar ou hidrofóbica. São compostos tenso-ativos capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial nas interfaces entre sólidos, líquidos e gases, permitindo-lhes assim, misturar ou dispersar prontamente como emulsões em água ou em outros líquidos (FIETCHTER, 1992; COLLA & COSTA, 2003).

Os biossurfactantes podem ser formados por biomoléculas neutras ou aniônicas, variando desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros. A parte hidrofóbica também é formada por hidrocarbonetos com cerca de 10 a 18 átomos de carbono, mas podem ser encontradas cadeias de ácidos graxos ligadas às proteínas ou peptídeos (BOGNOLO, 1999; BENTO; CAMARGO; GAYLARDE, 2008).

Os biossurfactantes com baixo peso molecular são geralmente glicolipídeos, com carboidratos ligados a uma longa cadeia alifática ou lipopeptídica (KREPSKY et al., 2007; BENTO; CAMARGO; GAYLARDE, 2008). Dentre estes há os raminolipídeos, lipídeos de trealose, sofrólipídeos, que são dissacarídeos com longa cadeia de aminoácidos acilada ou hidroxíácidos graxos. O mais conhecido é o ramnolipídio produzido por várias espécies de *Pseudomonas*, que consiste de 2 moles de raminose e ácido  $\beta$ -hidroxidecanóico (RON & ROSENBERG, 2002).

Estes compostos apresentam potencial considerável em aplicações comerciais em diversos setores. Têm vantagens sobre os surfactantes de origem sintética em relação à biodegradabilidade e por apresentar baixa toxicidade.

Os mesmos possuem potencial e desempenho eficaz em vários campos, como em estudos de recuperação avançada de petróleo e biorremediação de hidrocarbonetos do ambiente; possuem ainda aplicações potenciais na agricultura, cosméticos, produtos

farmacêuticos, detergentes, produtos de higiene pessoal, processamento de alimentos, fabricação de têxteis, materiais de lavanderia, tratamento de metais e o processamento do papel, da celulose e na indústria de tintas, assim como o aumento da adsorção de moléculas; formação de micelas; formação de macro e microemulsões; aumento da dispersão ou agregação de sólidos; ação espumante, aumento da solubilidade e molhabilidade ou detergência (CIAPINA, 2008; DHARA, SACHDEV, CAMEOTRA, 2013).

A enorme demanda do mercado para surfactantes é atualmente satisfeita por vários produtos químicos, principalmente, à base de petróleo. Esses compostos são geralmente tóxicos para o meio ambiente e não-biodegradáveis. Eles sofrem um processo de bioacumulação e sua produção, processos e subprodutos podem ser perigosos para o ambiente. Para Decesaro et al. (2013) é preferível utilizar agentes menos tóxicos e biodegradáveis.

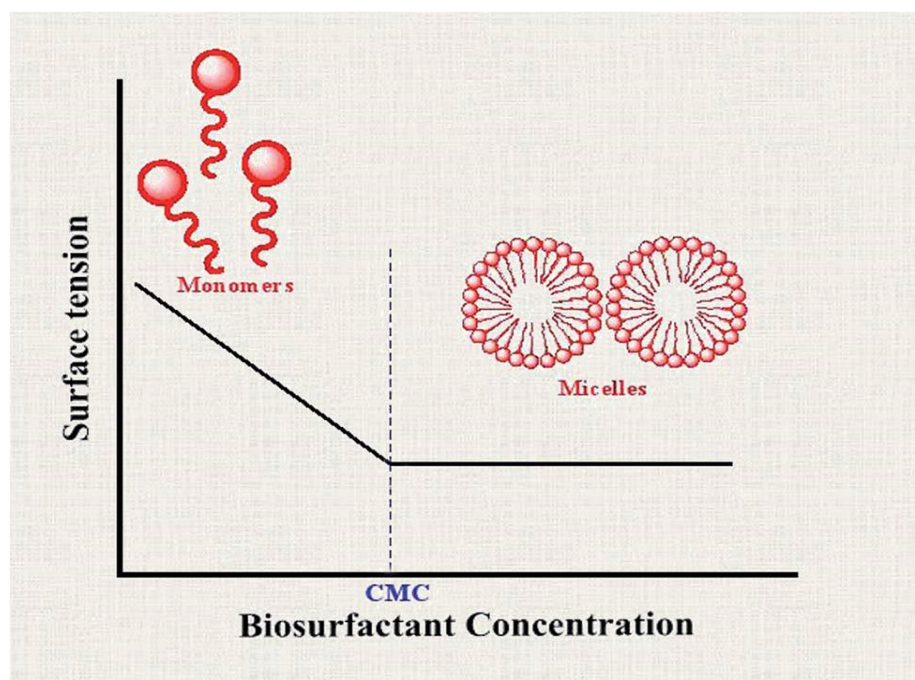
O endurecimento das regulamentações ambientais e o aumento da consciência das pessoas, para a necessidade de proteger os ecossistemas, efetivamente, resultou em um crescente interesse pelos biossurfactantes como possíveis alternativas aos surfactantes sintéticos. Os biossurfactantes aumentam a interação superficial água/óleo, e dessa forma, aceleram a degradação de vários óleos por micro-organismos e promovem a biorremediação de águas e solos (BANAT, MAKKAR, CAMEOTRA 1995; BENTO; CAMARGO; GAYLARDE, 2008).

Os biossurfactantes apresentam vantagens em relação aos surfactantes sintéticos. Piróllo (2006) destacou as seguintes vantagens:

- Alta biodegradabilidade;
- Baixa toxicidade;
- Biocompatibilidade e biodigestibilidade, que permitem suas aplicações em cosméticos, produtos farmacêuticos e como aditivos em alimentos;
- Possibilidade de produção, a partir de fontes de baixo custo e resíduos industriais;
- Especificidade de aplicações, já que são moléculas orgânicas complexas, com grupos funcionais específicos;
- Uso em biorremediação de locais impactados por óleos e biodegradação e detoxificação e efluentes industriais;

- Eficácia em condições extremas de temperatura, pH e salinidade.

Em soluções líquidas, os agentes tensoativos anfipáticos, frequentemente, formam micelas, quando presentes acima de uma concentração mínima (Concentração Micelar Crítica- CMC) (SANTOS, 2007; MILLIOLI, 2009; SOURAV et al., 2015) (Figura 2).



Fonte: Sourav et al. (2015)

Figura 2. Concentração micelar crítica de biossurfactantes

## 2.2 Classificação dos biossurfactantes e bioemulsificantes

Os biossurfactantes e bioemulsificantes são considerados uma classe de surfactantes naturais ou verdes, enquanto os surfactantes sintéticos são classificados pela natureza do seu grupo polar. Os biossurfactantes são diferenciados pela natureza química da biomolécula e pela espécie microbiana produtora. Os surfactantes microbianos são moléculas complexas com grande diversidade de estruturas químicas (BENTO, CAMARGO, GAYLARDE, 2008), ainda para estes autores o tipo de biossurfactante, muitas vezes é específico do gênero, e às vezes da espécie.

Os biossurfactantes seguem a classificação de Ron & Rosenberg (2002), ou seja, moléculas de alto e baixo peso molecular. Assim os principais biossurfactantes que correspondem a essa classificação são: glicolídeos, lipopeptídios e lipoproteínas,

fosfolipídeos e ácidos graxos, polímeros e biossurfactantes particulados e seus respectivos micro-organismos produtores (Tabela 2).

**Tabela 2.** Principais tipos de biossurfactantes e micro-organismos produtores

Biossurfactante				
Grupo	Subgrupo	Classe	Micro-organismo	
Baixo peso molecular	Glicolipídeos	Rhamnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
		Sophorolipídeos	<i>Pseudomonas</i> sp.	
		Trehalolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i>	
		Cellobiolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium</i> sp.	
			<i>Ustilago zea</i> , <i>U. maydis</i>	
	Lipopeptídios e lipoproteínas	Surfactina	Viscosina	<i>Bacillus subtilis</i>
			Peptídio-lipídeo	<i>P. fluorescens</i>
			Ácidos graxos	<i>B. licheniformis</i>
		Ácido-graxo, lipídio neutro e fosfolipídeos	Lipídios neutros	<i>Corynebacterium lepus</i>
			Fosfolipídeos	<i>C. lepus</i>
			<i>T. thiooxidans</i>	
Alto peso molecular	Surfactantes poliméricos	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	
		Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i>	
		Alasan	<i>A. radioresistens</i>	
		Liposan	<i>Candida lipolytica</i>	
	Surfactantes Particulados	Vesículas e fimbrias	<i>A. calcoaceticus</i>	
		Células inteiras	Várias bactérias	

Fonte: Bento, Camargo, Gaylarde (2008); Sourav et al. (2015)

### 2.3 Fatores que afetam a produção de biossurfactantes

Para Sourav et al., (2015) a produção de biossurfactante não só depende da estirpe produtora, mas também das condições de cultura. Assim, uma grande quantidade de parâmetros afetam não só a quantidade de biossurfactante, mas também o tipo de produto gerado.

- **Fatores ambientais**

Para se ter uma grande quantidade de biossurfactantes, é sempre essencial otimizar o bioprocessamento e para isso é necessária a combinação de diferentes fatores tais como: pHs, temperatura, arejamento e velocidade de agitação, como exemplo verifica-se o estudo do



pH sobre a produção do biotensoativo realizado por Jackisch-Matsuura et al. (2004; 2014) onde relataram a utilização de diferentes pHs na otimização da produção de biossurfactantes, utilizando a bactéria *Gordononia* sp. porém na acasião não foram observadas diferenças significativas de produção utilizando diferentes pHs. Soares (2014) usou bactérias do gênero *Bacillus* em pH 7 na produção de surfactantes e como fonte de carbono utilizou o suco de cajú clarificado e seus resíduos na intenção de produzir biossurfactantes do tipo ramnolipideos.

A temperatura é outro fator que pode influenciar no processo de produção e estabilização do biotensoativo, onde pequenas variações podem afetar a produção. A maior parte dos biotensoativos relatados até agora em diferentes trabalhos foram produzidos em temperaturas de 25 a 30 °C (SOURAV et al., 2015). Como exemplo, Faria (2010); Soares (2014) avaliaram diferentes temperaturas que poderiam influenciar na produção e estabilidade dos biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* e *Bacillus* sp., respectivamente.

Arejamento e agitação facilitam a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase aquosa. Esses são fatores significantes e influenciam a produção de biossurfactantes (SOURAV et al., 2015). Foi observado por Oliveira et al. (2008) uma elevada produção de biossurfactante utilizando frascos do tipo Wheaton (250 mL) com superfície interna irregular, base convexa e com maior área para oxigenação e superfície de adesão e Erlenmeyers (250 mL) frascos com superfície interna lisa, cônicos e com menor área para oxigenação com substrato de adesão menor que os anteriores e agitação entre 150 a 180 rpm, que melhoram a oxigenação e conseqüentemente a produção de biossurfactantes.

### **Fatores nutricionais**

O tipo, a qualidade e a quantidade de biossurfactante produzido são afetados e influenciados por vários fatores nutricionais tais como:

Fontes de carbono que apresentam um significativo papel no crescimento, bem como a produção de biossurfactantes por vários micro-organismos: Glicerol, glicose, manitol, sódio e etanol são fontes de carbono solúvel em água que podem ser utilizados para este fim. Pode-se considerar ainda n-alcanos, assim como resíduos ricos em fonte de carbono como da farinha de mandioca (manipueira ou tucupi). Suryanti et al. (2013) utilizaram os resíduos da produção de farinha de mandioca com o intuito de produzir

biossurfactantes a partir de bactérias *P. fluorescens*; a utilização desse ingrediente influenciou na identificação de produção de biossurfactantes do tipo rhamnolípido.

Fontes de nitrogênio são necessárias para o crescimento microbiano no que consistem a síntese de proteínas e enzimas. Desta forma o azoto é importante no meio para induzir a produção de biotensioativos. Existem vários compostos que contêm nitrogênio e que podem ser utilizados, tais como: extrato de levedura, sulfato de amônio, nitrato de amônio, peptona, nitrato de sódio, extratos de malte e de carne, têm sido relatados e utilizados para a produção de biossurfactantes. Verifica-se contudo, que o extrato de levedura é a principal fonte de nitrogênio usada para produção de biossurfactante em diferentes trabalhos (CIAPINA, 2008; ABBASI et al., 2013; JACKISCH-MATSUURA et al., 2014; SOURAV et al., 2015).

O aumento da produtividade de glicolídeos (ramnolípido) é visto como uma relação existente entre a quantidade de carbono e nitrogênio (C/N) e a proporção de carbono inorgânico e fósforo (P/C). Estes parâmetros foram estudados por Ciapina (2008), dentre outros, na produção de biossurfactantes a partir de *Bacillus* sp. em biorreator.

O tempo de incubação também tem um significativo efeito sobre a produção de biossurfactante. Diferentes micro-organismos são capazes de produzir biossurfactantes em diferentes intervalos de tempo. Usando gordura animal, a produção máxima de biossurfactante por *Candida bombicola* foi observada por até 68 h de incubação por Sourav et al. (2015).

### **Estratégias de cultivo**

Estratégias de cultivo para biossurfactantes incluem a agitação em aparelhos *shaker*, batelada alimentada ou contínua. A maioria dos estudos sobre este tema envolvem a otimização das condições de cultivo com agitação em *shaker*. Também são utilizados biorreatores em batelada alimentada ou contínuo na fermentação para a produção de biotensioativo. Uma das principais desvantagens para a produção em biorreator é a intensa formação de espuma causada pelo agente tensoativo quando a solução é arejada e agitada. Especificamente quando se utiliza a espécie *P. aeruginosa*, percebe-se formação de espuma abundante o que se dá devido à presença de proteínas extracelulares (BENTO, CAMARGO, GAYLARDE, 2008; SOURAV et al., 2015).

## Métodos de recuperação

Os métodos para a recuperação de biossurfactantes são: precipitação ácida, extração por solventes, cristalização, precipitação com sulfato de amônio e centrifugação. Métodos recentes de recuperação de biossurfactantes são o de espuma de fracionamento, ultra filtração e adsorção-dessorção em resinas de poliestireno e cromatografia de permuta iônica.

## Estratégias de melhoria da linhagem

Abordagens metabólicas e engenharia celular têm sido aplicadas com sucesso para melhorar a redução da tensão superficial em vários casos. Assim, a integração da engenharia genética e da biologia é um aprofundamento necessário, a fim de obter rendimentos de baixo custo e elevada produção de biossurfactante (SOURAV et al., 2015).

## 2.4 Elucidação de estruturas de biossurfactantes

Diversas técnicas analíticas combinadas ou utilizadas de forma individual podem ser empregadas na elucidação completa de biossurfactantes. Essas técnicas são classificadas em: cromatográficas e espectroscópicas. As mais conhecidas são TLC, HPLC, FTIR, GC-MS, RMN, LC-MS e FAB-MS.

**Tabela 3.** Diferentes técnicas analíticas empregadas na elucidação de biossurfactantes

Biossurfactantes	Método analítico	Referências
Lipideos	FTIR e MS	Abbasi et al. (2013)
Ramnilipideos	FTIR	Suryanti et al. (2015)
Lipopeptídios	GC/MS, ESI Q-TOF/MS, 1H-NMR.	Liu et al. (2008)
Lipopeptídio	ESI-Q-TOF-MS e CG MS	Peng et al. (2008)
Surfactina	GC-MS e Q-TOF MS/MS	Jia, Shi-Zhong, Bo-Zhong, (2015)

## **2.5. Desafio na produção de biossurfactantes de origem microbiana**

O principal desafio para a produção de biossurfactantes na atualidade diz respeito à combinação de fontes alternativas de baixo custo que possa fazer frente à produção sintética de surfactantes, pois a produção de biossurfactantes de origem microbiana ainda é muito cara devido aos custos da produção e aos métodos pouco eficientes de recuperação. Para Colla & Costa (2003), Mariano et al. (2009), Bezerra et al. (2012) e Antunes et al. (2013) entre outros, relataram que o problema econômico da produção de biossurfactantes pode ser significativamente reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis e de baixo custo.

Uma possível alternativa seria o uso de subprodutos agrícolas ou de processamento industrial. Com o aumento dos esforços no desenvolvimento de novas tecnologias de aplicação, no melhoramento das linhagens e dos processos de produção, e devido à sua versatilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, os biossurfactantes poderão se tornar compostos de uso comum e de baixo custo nas indústrias em um futuro próximo. NITSCHKE & PASTORE (2002).

## **2.6 Sociedade atual e a biorremediação**

Na sociedade atual, o consumo de petróleo tem provocado inúmeros problemas relacionados à poluição em diversos ambientes no Brasil e no mundo, ocasionados geralmente por acidentes como vazamento de petróleo e de seus derivados. Assim, há preocupação crescente no que diz respeito ao processo de biorremediação de ambientes impactados (BATISTA, 2009).

Tonini, Rezende, Gravitou (2010) destacaram que isto se dá devido aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) de origem petrogênica, um dos poluentes de maior persistência, que apresentam propriedades tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas aos seres humanos. O aumento da população e a maior atividade industrial fizeram com que o problema da poluição do ambiente atingisse níveis alarmantes: vários são os poluentes hoje gerados pelas diferentes indústrias, que de alguma forma utilizam o petróleo e seus derivados como fonte de energia (AZEVEDO, 2008).

## 2.7 Petróleo e seus impactos

O petróleo teve origem na decomposição de matéria orgânica, principalmente o plâncton (plantas e animais microscópicos em suspensão nas águas), causada pela ação de bactérias em meios com baixo teor de oxigênio. Ao longo de milhões de anos, essa decomposição foi se acumulando no fundo dos oceanos, mares e lagos e, pressionada pelos movimentos da crosta terrestre, transformou-se neste composto que hoje apresenta ampla utilização nos mais diversos setores da atividade humana. Esse composto é encontrado em bacias sedimentares específicas, formadas por camadas ou lençóis porosos de areia (NEIVA, 1993; IAE, 2003).

O petróleo é constituído por uma mistura complexa de hidrocarbonetos (alifáticos ou aromáticos), e em menores quantidades, por compostos não hidrocarbônicos e outros componentes orgânicos, alguns constituintes organometálicos, especialmente complexos de vanádio e níquel. É oleoso, inflamável, menos denso que a água, com cor variando entre negro e castanho escuro e odor característico (TONINI, REZENDE, GRATIVOL, 2010).

O petróleo é utilizado desde 5.000 anos A.C, pelas civilizações antigas no Egito, Fenícia, Mesopotâmia, Pérsia, China e nas Américas pelos Incas e Astecas (PIRÔLLO, 2006).

Mesmo sendo bastante conhecido desde os primórdios, a exploração do petróleo iniciou-se em larga escala em meados do século XIX, possibilitando a utilização de derivados do petróleo como componentes explosivos (TNT), matéria sintética para roupas e medicamentos, sendo bastante utilizados na Segunda Guerra Mundial. A partir desse fato a indústria petrolífera teve grande expansão. Durante muitas décadas, o petróleo foi o grande propulsor da economia internacional, chegando a representar, no início dos anos 70, quase 50% do consumo mundial de energia primária. Embora declinante ao longo do tempo, sua participação nesse consumo ainda representa cerca de 43%, segundo a Agência Internacional de Energia (2003), e deverá manter-se expressiva por algumas décadas.

A utilização do petróleo não se limita somente à produção de energia, mas também, serve para a produção de plástico, material sintético para roupas, solventes, borrachas sintéticas, tintas, corantes, adesivos, solventes, detergentes, explosivos e produtos farmacêuticos.

A indústria do petróleo, inevitavelmente, gera grandes quantidades de óleo e resíduos viscosos chamado lodo oleoso formado durante produção e refino (KINGSTON, 2002). Os pequenos vazamentos provenientes do transporte marítimo correspondem a 98% das perdas totais de petróleo e derivados. As perdas acidentais correspondem aos 2% restantes, que contribuem com o lançamento de aproximadamente 400 mil ton/ano de óleo no ambiente. Devido a isso o contato com o petróleo pode acarretar problemas para os organismos que vivem na água no solo e conseqüentemente para toda a cadeia alimentar (PIRÔLLO, 2006).

Quando o óleo é derramado na água, a princípio, somente os componentes solúveis afetam os organismos que vivem na superfície. Porém, quando ventos, ondas e correntes agem sobre a mancha de óleo, misturando-a à água, outros componentes não solúveis, passam também a afetar os organismos ali presentes. Quanto mais solúvel for o composto, mais tóxico ele será (PEDROTI, 2007). Com o objetivo de amenizar tais impactos ocorrentes em ambientes contaminados pela ação de hidrocarbonetos, têm-se utilizado técnicas de biorremediação, que representam uma alternativa aos demais processos de remediação.

## **2.8 A biorremediação como alternativa para detoxificação do ambiente**

A biorremediação é bastante atraente do ponto de vista econômico, quando comparado a outras técnicas de remediação, com utilização de compostos sintéticos. Micro-organismos são usados em processos de biorremediação, entretanto, é necessário o emprego de espécies autóctones, para se chegar a um maior sucesso no tratamento de ambientes contaminados. A busca de micro-organismos em ambientes contaminados por hidrocarbonetos aumenta o sucesso de se conseguir os mais aptos para “limpeza” de contaminantes (LUZ et al., 2011).

As buscas por novas técnicas de remediação de poluentes do petróleo são necessárias, devido aos malefícios que esses podem provocar. Netto et al. (2000) ressaltaram que os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) e seus derivados estão relacionados a diversos tipos de câncer, com elevada taxa de novos casos. Os HPAs podem causar câncer por interação dos produtos dos derivados do petróleo com o DNA humano, alterando-o.

A biorremediação consiste principalmente na utilização de micro-organismos que fazem frente à poluição por hidrocarbonetos, diminuindo as concentrações destes poluentes no ambiente.

## 2.9 Micro-organismos endofíticos, epifíticos, características, ação biodegradadora e potencial biotecnológico

Os micro-organismos endofíticos e epifíticos, segundo Azevedo et al. (2000) são aqueles que habitam pelo menos um período do seu ciclo de vida, o interior de um vegetal, em oposição aos epifíticos que vivem na superfície das plantas.

Fungos e bactérias são micro-organismos associados aos vegetais e frequentemente são isolados e testados em diferentes ensaios biológicos. Os fungos são conhecidos pela sua diversidade e habilidade notável para degradar materiais naturais complexos e persistentes, tais como lignina, quitina e celulose micro cristalina (OLIVEIRA et al., 2008).

Muitos fungos possuem capacidade enzimática para degradar hidrocarbonetos do petróleo. Alguns degradam alcanos (normal, ramificado, cíclico), outros aromáticos, e outros degradam tanto hidrocarbonetos aromáticos quanto alcanos.

Frequentemente, os n-alcanos com número de carbonos, variando entre C10 a C26 são degradados, assim como os compostos tóxicos mono aromáticos benzeno, tolueno e xileno (ATLAS, 1995). As espécies dos gêneros *Cladophialophora* e *Exophiala* assimilam tolueno; *Aspergillus* e *Penicillium* spp. degradam os hidrocarbonetos alifáticos, clorofenóis, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), pesticidas, corantes sintéticos e 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) (HARMS, SCHLOSSER, WICK, 2011).

A habilidade dos fungos em utilizar hidrocarbonetos ocorre principalmente em duas ordens: Mucorales e Moniliales. Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* possuem muitas espécies que assimilam hidrocarbonetos, contudo, esta característica é uma propriedade individual da espécie e não, necessariamente, uma característica particular do gênero (RISER-ROBERTS, 1992).

Algumas características dos fungos filamentosos, como a bioatividade e o crescimento morfológico, os tornam melhores degradadores potenciais que as bactérias. Além disso, os fungos são capazes de crescer sob condições ambientais de estresse: meios com baixos valores de pH, pobres em nutrientes e com baixa disponibilidade de água, favorecendo o seu desenvolvimento diante de outros micro-organismos (MOLLEA, BOSCO, RUGGERI, 2005).

As bactérias endofíticas podem ser definidas como aquelas que vivem no interior das plantas, sistematicamente, sem causar danos e podendo conferir benefícios aos seus hospedeiros, resultando em um sistema simbiótico reconhecido e com características específicas (PEREIRA, SOUZA, HANADA, 2007). Bactérias desenvolvem-se com um pH ótimo entre 5 e 9.

Bactérias endofíticas possuem íntima ligação com seus hospedeiros por meio de processos co-evolutivos e podem interferir na fisiologia da planta (MISHAGI & DONNDELINGER, 1990) e sua habilidade de sobreviver dentro dos tecidos vegetais as tornam candidatas potenciais a aplicações biotecnológicas (SOBRAL, 2003).

As bactérias podem produzir biossurfactantes de baixo ou alto peso molecular que eficientemente reduzem ou não a tensão de superfície e a tensão interfacial da água ou provocam formação de emulsões sem necessariamente reduzir a tensão superficial, geralmente desenvolvem-se bem em pH ótimo entre 5 a 8 (SKALADANY & METTING, 1993; BENTO, CAMARGO, GAYLARDE, 2008).

## **2.10 Macrófitas aquáticas e micro-organismos associados**

As macrófitas (plantas aquáticas) constituem uma importante comunidade dos ecossistemas aquáticos, por sua abundância, alta produtividade de biomassa e por sua contribuição para a diversidade biológica. Frequentemente, em ambientes com influência antrópica, esses vegetais proliferam indesejadamente e prejudicam a utilização de lagos, represas e rios, havendo a necessidade da aplicação de técnicas de controle. Por outro lado, estes têm sido utilizados em sistemas de tratamento de efluentes e na recuperação de ambientes degradados devido a sua associação com diferentes micro-organismos fungos e bactérias (BATISTA, 2009).

Araújo (2014) estudou a presença de micro-organismos endofíticos e epifíticos, isolados de macrófitas aquáticas coletadas em ambientes com históricos de contaminação por petróleo. Destaca-se neste trabalho a ocorrência de bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus pumilus*, assim como os fungos *Curvularia trifolii*, *Curvularia clavata* que foram utilizados em diferentes testes para evidenciar o potencial quanto a biodegradação de hidrocarbonetos.

De Jesus et al. (2015) destacaram que as macrófitas, assim como os micro-organismos associados e as respectivas enzimas, podem ser aplicadas, por meio de técnicas agrônomicas, para degradar ou reduzir a níveis não tóxicos os contaminantes



ambientais a fim de recuperar o solo ou águas contaminadas por diferentes poluentes, como os metais pesados (Cr > Ni > Cu > Fe > Zn > Mn) e hidrocarbonetos.

Para Pedralli (2003); Diniz et al., (2005) as macrófitas são importantes indicadores de poluição, pois são sedentárias, acumuladoras de poluentes, possuem longo ciclo de vida, resistentes à manipulação e transporte, de fácil manutenção e coleta; além disso, apresentam associação com diferentes micro-organismos como fungos e bactérias. Podem ser consideradas macrófitas aquáticas, os vegetais visíveis a olho nu com partes fotossinteticamente ativas permanentemente, ou por diversos meses, todos os anos, total ou parcialmente submersas em água doce ou salobra, podendo ainda ser flutuantes (GASTAL & IRGANG, 1997). Entretanto, há algumas divergências na definição de macrófitas por diferentes autores, sendo que alguns consideram macrófitas também as plantas de margem que mantêm relação com a água em abundância (VIANA, 2005).

A espécie *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (Pontederiaceae) é mais popularmente conhecida como mureru ou aguapé, se caracteriza por ser aquática flutuante livre, nativa da América do Sul, pertencente à família Pontederidaceae, se reproduz sexuadamente por sementes, viáveis por pelo menos 15 anos no sedimento dos corpos d'água (HOLM & YEO, 1980). Esta espécie é uma das macrófitas mais abundantes na Amazônia, possui importante função na purificação de água contaminada, inclusive retirando metais pesados (SPINDOLA, 2007) (Figura 3).



**Figura 3.** *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (Pontederiaceae)

A espécie *Cyperus ligularis* L. (Cyperaceae) é uma planta perene herbácea com o ciclo fotossintético C4, ereta de caule triangular, medindo de 10 a 60 cm de altura, folhas brilhantes de coloração verde escuro medindo de 5 a 12 cm, glabras basais menores que o caule medindo de 10 a 30 cm de comprimento por 3 a 6 mm de largura, inflorescências terminais em umbelas compostas com muitas espiguetas de coloração marrom. Produz rizomas e tubérculos considerados estimulantes e afrodisíacos (LORENZI, 2008) (Figura 4).



**Figura 4.** *Cyperus ligularis* L. (Cyperaceae)

A espécie *Ichnanthus calvescens* Doll (Poaceae) os exemplares de *Ichnanthus calvescens*, em sua maioria, apresentam pilosidade nas bainhas foliares e no colo, bem como na região externa e interna à base dos ramos da inflorescência, pelo menos nos inferiores, e têm os eixos da mesma escabros (BOECHAT, 2005) (Figura 5).



**Figura 5.** *Ichnanthus calvescens* Döll (Poaceae)

## **2.11 Enzimas e aplicações biotecnológicas**

Enzimas são proteínas com estruturas especiais que catalisam reações químicas com grande especificidade. Embora as enzimas sejam produzidas intracelularmente, as de origem extracelular são importantes no processo industrial, devido à simplicidade no processo de isolamento a partir de diferentes meios de cultivo (PALHETA, 2011).

Nos seres vivos, as enzimas estão envolvidas em todos os processos bioquímicos, no entanto, para a atuação desses catalizadores há a necessidade de condições especiais, pois são funcionais em uma faixa estrita de acidez-alkalinidade e são sensíveis a mudanças físico-química como pH e temperatura do meio (MUSSATO, FERNANDES, MILAGRES, 2007).

Enzimas são produzidas por seres vivos, tais como plantas, animais, porém as de origem microbiana se destacam devido à ampla diversidade bioquímica, a susceptibilidade à manipulação genética e a facilidade de produção em larga escala. Além dessas vantagens, nessas enzimas predominam as características desejáveis para as aplicações biotecnológicas nos diversos ramos industriais (PALHETA, 2011).

A utilização de micro-organismos para fins industriais e biotecnológicos, nos últimos 20 anos, tem aumentado rapidamente. As técnicas recentes de biologia molecular, como a engenharia genética, oferecem oportunidades para o aperfeiçoamento de diversos processos de produção e desenvolvimento de novas enzimas (ARAÚJO et al., 2010).

O interesse por enzimas está em expansão, especialmente as de origem fúngica com destaque na produção de alimentos, medicamentos e análises clínicas, em panificação, na indústria de laticínios, celulose e papel, têxtil, detergentes, cosméticos, tratamento de efluentes e na produção de biocombustíveis (PALHETA, 2011).

Para Maitan (1998) apud Cuzzi (2011), a aplicação industrial de micro-organismos como as bactérias, leveduras e fungos filamentosos, representa atualmente uma indústria altamente diversificada e com rendimentos econômicos considerados astronômicos, destacando o álcool etílico, laticínios, ácidos orgânicos e fármacos; incluindo os antibióticos e ainda com mais destaque as enzimas para uso industrial, biodegradação de compostos tóxicos em tratamentos de efluentes e a biorremediação ambiental.

Pereira (2012) relatou que a utilização de micro-organismos e/ou suas enzimas, apresentam grande potencial para minimizar os impactos gerados por substâncias recalcitrantes na natureza, transformando-as em moléculas com pouca ou nenhuma toxicidade, através da utilização das mesmas como nutrientes ou por biotransformações.

Devido ao grande número de enzimas envolvidas na degradação de xenobióticos, a maioria não possui a capacidade de degradar os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HAPs) o que justifica a necessidade de se selecionar micro-organismos degradadores, visando a sua utilização (ALMEIDA et al., 2012).

Almeida et al., (2012), chamaram a atenção para o fato de que a produção de enzimas do grupamento polifenoloxidase são de extrema importância na área biotecnológica, pois são enzimas responsáveis pela quebra da lignina e de polímeros complexos como efluentes industriais e hidrocarbonetos do petróleo e que micro-organismos dessa natureza, ou seja, produtores dessas enzimas podem ser facilmente empregados em processos de descontaminação de ambientes poluídos.

Existem inúmeras vantagens em obter surfactantes de origem microbiana, uma delas é que possuem baixa toxicidade, quando comparados com surfactantes sintéticos, além disso, sua produção pode ocorrer a partir de substratos renováveis contribuindo assim, para diminuir a contaminação ambiental e a emissão de gases de efeito estufa.

Os biossurfactantes possuem importância quando se pensa nas inúmeras aplicações na geração de produtos industrializados, daí a necessidade de desenvolver pesquisa relacionada à busca por novos surfactantes a partir da biodiversidade amazônica, com o intuito de gerar novos biossurfactantes, para que no futuro estes possam ser utilizados em processos de biorremediação de ambientes contaminados por petróleo e seus

derivados ou serem utilizados na fabricação de produtos de limpeza, de processamento de polpa, na clarificação do papel, assim como, na produção têxtil e em aplicações médicas.

Embora haja uma ampla aplicação dos surfactantes na sociedade atual em diversos setores da indústria é na indústria petrolífera, que se verifica maior interesse em função do aumento da solubilidade dos componentes do petróleo; a recuperação de derivados e a sua utilização na limpeza de tanques, assim como no preparo de misturas óleo-álcool para combustíveis e dispersão de óleos derramados em ecossistemas aquáticos.

Destaca-se, ainda a importância de se conhecer melhor o potencial biotecnológico da biodiversidade associadas às três diferentes espécies de macrófitas aquáticas, selecionadas para estudos na produção de novos surfactantes. Assim como, de se gerar conhecimento mais consolidado a respeito destes compostos a partir desses microorganismos da região Amazônica.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de biossurfactantes por fungos e bactérias endofíticas e epifíticas, isoladas de macrófitas aquáticas, coletadas em áreas com histórico de contaminação por petróleo.

### 3.2 Objetivos específicos

- Reavaliar linhagens de micro-organismos envolvidos na degradação de hidrocarbonetos, isolados a partir de três espécies de macrófitas aquáticas *E. crassipes*, *I. calvescens* e *C. ligularis*, coletadas em áreas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo e seus derivados;
- Selecionar linhagens de fungos e bactérias, por meio de teste de biodegradabilidade, emulsificação e colapso da gota;
- Identificar, taxonomicamente, os micro-organismos, por meio da subunidade 16S (bactérias) e região ITS1 e ITS4 (fungos);
- Determinar as melhores condições de crescimento de micro-organismos selecionado para a produção de biossurfactantes;
- Purificar e caracterizar o biossurfactante produzido pela cultura microbiana selecionada em escala laboratorial;
- Determinar a taxa de redução da tensão superficial, atividade de emulsificação e compará-las às de surfactantes sintéticos;
- Avaliar a citotoxicidade do biossurfactante produzido pela linhagem selecionada;
- Avaliar a atividade enzimática dos isolados fúngicos.

#### 4. JUSTIFICATIVA

O trabalho proposto possui relevância devido à vantagem de se obter surfactantes de origem microbiana, seja de fungos, bactérias ou leveduras, pois estes possuem baixa toxicidade quando comparados com os surfactantes sintéticos, além disso, sua produção pode ocorrer a partir de substratos renováveis como sobras da indústria de produção de farinha de mandioca, melação de cana de açúcar, diesel, glicerol entre outros contribuindo assim, para diminuir a contaminação ambiental e a emissão de gases de efeito estufa.

Os biossurfactantes possuem um mercado em ascensão, pois estima-se que haja um aumento anual de 35% por novos biossurfactantes no mercado mundial. Esse aumento na produção de biossurfactantes, explica-se devido às suas características peculiares como: produção por meio de processos fermentativos, suas aplicações sem potencial risco ambiental, recuperação de resíduos de petróleo, cuidados à saúde e aplicação farmacêutica, além de sua possível utilização na indústria de alimentos.

Apresentam inúmeras aplicações na geração de produtos industrializados, daí a necessidade de desenvolver pesquisa relacionada à busca por novos exemplares a partir da biodiversidade amazônica; e com isso descobrir novos compostos, para que no futuro estes possam ser utilizados em processos de biorremediação de ambientes contaminados por petróleo e seus derivados ou serem utilizados na fabricação de produtos de limpeza, de processamento de polpa, na clarificação do papel; assim como, na produção têxtil e em aplicações médicas.

Embora haja uma ampla aplicação dos surfactantes na sociedade atual em diversos setores da indústria, é na indústria do petróleo a sua mais expressiva aplicação, devido ao aumento da solubilidade de seus componentes; na recuperação de seus derivados, e a utilização na limpeza de tanques de petróleo, assim como, a retirada de óleos derramados em ecossistemas aquáticos.

Observa-se ainda que a maioria dos surfactantes utilizados em diferentes aplicações da indústria seja ela do petróleo, farmacêutica ou alimentar, é notadamente sintética, e devido às modificações estruturais pelas quais passam, podem gerar compostos tóxicos para o meio ambiente, ou gerar problemas de saúde como alergias ou intoxicação. Daí a necessidade de pesquisar surfactantes de origem microbiana para garantir a segurança ambiental e de saúde pública na sua utilização, uma vez que a maioria desses

biossurfactantes, não apresenta toxicidade, segundo estudos relatados na literatura para diferentes concentrações utilizadas (MOLDES et al., 2013; SOURAV et al., 2015).

Destaca-se, ainda a importância de se conhecer melhor o potencial biotecnológico da biodiversidade associadas às diferentes espécies de macrófitas aquáticas coletadas em ambientes impactados por hidrocarbonetos, para a identificação de diferentes biossurfactantes. Assim como gerar conhecimento mais consolidado a respeito destes compostos a partir dos diferentes micro-organismos selecionados.



## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Amostras e material biológico

Os isolados utilizados fazem parte da Coleção de Culturas do Laboratório de Biodegradação da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

As espécies vegetais foram coletadas próximo à saída dos efluentes da Refinaria da Petrobrás/Manaus-AM (REMAN). Foram utilizados no estudo micro-organismos (fungos e bactérias). Os fungos epifíticos isolados de *C. ligularis* foram: (S31 e S36) *Phoma* sp., (S24 e S25) *Rhizopus oryzae*; (S32, S33, S42) *Fusarium* sp. Entre os endofíticos provenientes de *E. crassipes*, (S42 e S51) *Fusarium* sp. Dentre as bactérias isolados (SB43) *Escherichia* sp., (M87) *Microbacterium* sp. e (M111) *Bacillus* sp. São bacterias endofíticas provenientes de *E. crassipes*.

#### 5.1.2 Identificação das espécies botânicas

As espécies vegetais foram identificadas no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) com suas respectivas numerações de exsicatas depositadas no herbário do INPA. As espécies coletadas foram: *E. crassipes* (Mart.) Solms (Pontederiaceae) (número de catalogação INPA 259.239), *I. calvescens* Döll (Poaceae): (número de catalogação INPA 259.240) e *C. ligulares* L. (Cyperaceae): (número de catalogação INPA 259.241).

#### 5.1.3 Petróleo e diesel

Foi utilizado petróleo cru, proveniente da Base Petrolífera de Urucu, Amazonas, Brasil. Este petróleo é considerado leve e de alta qualidade (Lopes et al., 2005) e diesel provenientes de postos de combustíveis locais. As dosagens de petróleo e diesel foram utilizadas conforme descrita por Batista (2009).

## **5.2 Seleção preliminar de micro-organismos para produção de biossurfactantes**

### **5.2.1 Reativação de micro-organismos**

- **Fungos**

As vinte e cinco linhagens de fungos foram reativadas em placas de Petri, contendo meio Batata Dextrose e Ágar (PDA) a 28° C, por sete dias. Todos os fungos reativados com sucesso, foram cultivados em meio Bushnell-Haas (BH) líquido+petróleo, e após o crescimento micelial por um período de sete dias, foram utilizados como pré-inóculo para seleção de biossurfactantes.

- **Bactérias**

Quarenta e uma bactérias foram reativadas em meio Luria-Bertani (LB) + petróleo, por um período de 24 a 48 h, onde foi observado o crescimento. As bactérias que cresceram nesse período foram utilizadas na seleção preliminar de biossurfactantes.

### **5.2.2 Seleção preliminar de micro-organismos para a produção de biossurfactantes**

Para os fungos, o inóculo padrão foi de 5 mm de diâmetro. Estes inóculos foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio mineral Bushnell-Haas (1 g de fosfato de monopotássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 1 g de fosfato dipotássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 1 g de nitrato de amônia ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), 0,2 g de sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ), 0,05 g de cloreto de ferro ( $\text{FeCl}_3$ ), 0,02 g de dicloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) e 1 L de água destilada) acrescido de 0,5 mL de petróleo de Urucu. Os fungos foram incubados durante 14 dias, sob agitação de 120 rpm e temperatura de 30 °C. Foi utilizado como controle, frascos contendo o mesmo meio com o petróleo esterelizado, porém sem o fungo (BATISTA, 2009)

As bactérias foram cultivadas em 20 mL de meio mineral Bushnell-Haas, acrescido de 100 µL de petróleo de Urucu em tubos de plástico de 50 mL e 40 µL de caldo bacteriano de cada amostra. Foram utilizados como controle, 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 nove dias (BATISTA, 2009)

### 5.2.3 Processo de filtração

Os fungos e bactérias que cresceram em meio BH-líquido com petróleo, foram filtrados, com seringa e filtro estéreis. A porosidade do filtro foi de a 0,47  $\mu\text{m}$  e 0,22  $\mu\text{m}$ .

### 5.3 Teste de biodegradabilidade utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP)

O teste de biodegradabilidade foi realizado pela técnica do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) (HANSON, DESAI, ANJANA, 1993), com adaptações. Foi utilizado um inóculo padrão de cada micro-organismo. O experimento foi realizado em placa de poliestireno de 96 poços, e em tubos de ensaio. A concentração de indofenol foi ajustada para 0,010 g/L de Bushnell-Haas (BH) líquido. Em cada poço foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de solução de indofenol, 10  $\mu\text{L}$  de petróleo cru, e cultura de fungo correspondendo a 2 a 3 mm de diâmetro. As placas foram mantidas em temperatura ambiente ( $27\pm 2^\circ\text{C}$ ), sendo observado o tempo de 24 e 48 h. Como controle positivo, foi utilizado o indofenol com petróleo, e como controle negativo somente o indofenol.

As bactérias foram testadas nas mesmas condições citadas anteriormente para os fungos. Tubos de ensaio em duplicata continha 2 mL de indofenol e 25  $\mu\text{L}$  do inóculo bacteriano. Como controle positivo, foi utilizado o indofenol com petróleo, e como controle negativo somente o indofenol.

O princípio deste teste é que durante a oxidação dos hidrocarbonetos, elétrons sejam transferidos até aceptores como oxigênio, nitrato e sulfato. Ao incorporar um aceptor de elétron como o DCPIP ao meio de cultura, é possível averiguar a capacidade dos micro-organismos em utilizar hidrocarbonetos como substrato pela observação da mudança de cor do DCPIP de azul (oxidado) para incolor (reduzido) (MARIANO et al., 2009). As avaliações foram realizadas após 24 e 48 h, para detecção de atividade biodegradadora.

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

O teste foi realizado em placas de Petri, contendo 2,5 mL de extrato de crescimento do fungo e de bactérias, e uma gota de petróleo. O teste foi realizado em duplicata e fotografado nos tempos 0, 1, 5, 30, 1 h, 72 h. O resultado foi considerado positivo quando

houve formação dispersão da gota de petróleo. Como controle negativo foi adicionado 3,5 mL do extrato do meio BH + petróleo, e como controle positivo, foi usado o Dodecil Sulfato Sódio (SDS) 1 M.

### 5.5 Avaliação da atividade de emulsificação

Os filtrados de fungo e bactérias foram avaliados quanto à atividade de emulsificação água em óleo (A/O). Para cada 3,5 mL dos extratos das culturas, foram adicionados 2 mL petróleo de Urucu em tubos de ensaio, que foram agitados durante 2 minutos em vortex e deixados 24 h em repouso. O teste foi realizado em triplicata, após esse período, a altura do petróleo emulsificado (cm) foi comparada à altura total adicionada (COOPER & GOLDENBERG, 1987). O índice de emulsificação foi medido segundo as convenções adotadas por (PARASZKIEWICZ, KANWAL, DŁUGONSKI, (2001); JACKISCH-MATSUURA et al., (2004, 2014) e calculado conforme a equação (1):

$$E_{24} = \frac{H_e}{H_t} \times 100$$

Sendo:  $E_{24}$  = Índice de emulsificação após 24 h (%)

$H_e$  = Altura da emulsão

$H_t$  = Altura total

**Tabela 4.** Medida da atividade emulsificante

<b>Atividade Emulsificante</b>	<b>Altura para emulsão</b>
<b>Alta</b>	$\geq 2$ cm
<b>Moderada</b>	De 1 a 1,9 cm
<b>Baixa</b>	$< 1$ cm

**Fonte:** Jackisch-Matsuura (2004)

## **5.6 Produção de biossurfactantes por fungos e bactérias**

### **5.6.1 Linhagens selecionadas para a produção de biossurfactante**

Para a produção de bioemulsificante por meio da curva de produção e teste toxicológico com *Artemia Salina* foi utilizado o fungo *Phoma* sp.

Para a produção, extração e caracterização química de biossurfactantes foi selecionada a bactéria *Microbacterium* sp.

### **5.6.2 Preparo do inóculo**

Cada micro-organismo foi cultivado no meio de cultura mais adequado para seu crescimento, sendo a bactéria inoculadas em meio Luria-Bertani (24 e 48 h) e o fungo filamentosos em meio BDA (Batata Dextrose Agar) por nove dias.

### **5.6.3 Condições de cultivo para a produção de biossurfactante**

A produção de biossurfactante foi realizada em meio líquido base descrito no item 5.6.4 com 10% de óleo diesel. O pH foi mantido em 5,0 para fungos filamentosos e em 6,8 para as bactérias. A temperatura de incubação foi de 30° C em incubadora orbital (New Brunswick Scientific) com agitação constante de 120 rpm.

### **5.6.4 Meio líquido base para a produção de biossurfactante e condições de cultivo**

A produção de biossurfactante foi realizada em 50 mL de meio de cultura constituído de MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O 0,5 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, NaNO<sub>3</sub> 3 g/L, extrato de levedura 1 g/L e peptona 0,3 g/L, com pH ajustado em 5,0 para fungos filamentosos e 6,8 para as bactérias (modificado de RAPP & BACKHAUS, 1992). Como fonte de carbono foi utilizado óleo diesel a 10% v/v.

O cultivo microbiano foi realizado em frascos Erlenmeyer de 125 mL a 30° C em incubadora orbital (New Brunswick Scientific) com agitação constante de 150 rpm. Os fungos filamentosos foram cultivados por 12 e 20 dias e bactérias por até nove dias. Frasco Erlenmeyer com 50 mL de meio de cultura e 10% de óleo diesel ou petróleo, sem inóculo, foi utilizado como controle. O experimento foi realizado em triplicata.

Após o período de incubação, os meios de cultura foram filtrados com seringa estéril e membrana filtrante de 0,22  $\mu\text{m}$ . O meio livre de célula foi congelado a 4 °C para testes posteriores.

### **5.6.5 Curva de produção de biossurfactantes por fungos e bactérias**

Para avaliar o melhor tempo de produção de biossurfactantes foi realizado um ensaio em frascos Erlenmeyer de 125 mL com meio de cultura citado no item 5.6.4, com 50 mL do meio, como fonte de carbono foi utilizado o diesel a 10% v/v. O experimento foi realizado em triplicata. O inóculo padrão para as bactérias foi de 600 nm de densidade óptica – DO. Foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  do inóculo padronizado em cada um dos frascos utilizados. O tempo de observação para as bactérias foi a cada 24h. em um total de nove dias. Para os fungos os volumes de meios foram os mesmos usados para as bactérias. Para padronização do inóculo dos fungos foram utilizados cinco fragmentos de aproximadamente de 5 mm X 5 mm. A produção pelo fungo utilizado foi realizada a cada 48h durante 28 dias.

Cada cultivo foi filtrado em membrana millipore para bactérias 0,22  $\mu\text{m}$  e para fungos 0,45  $\mu\text{m}$ . O produto filtrado foi avaliado por meio da medida da altura emulsificada em triplicata. A análise estatística foi realizada por meio de médias e desvio padrão calculados com o *software* BioEstat 5.3 (AYRES et al., 2007).

### **5.6.6 Avaliação da atividade emulsificante**

A produção de biossurfactantes foi avaliada por meio da atividade de emulsificação do tipo A/O (água em óleo). Para isso foram transferidos para um tubo de ensaio 3,5 mL do caldo de cultura livre de células e adicionado 2 mL de óleo diesel ou petróleo a 3,5 mL do caldo de cultura. Em seguida, cada tubo foi agitado vigorosamente em vortex por 2 min. Após 24 h, a altura da emulsão água em óleo foi medida e expressa em centímetros (COOPER & GOLDENBERG, 1987).

### **5.6.7 Avaliação da tensão superficial**

A medida da tensão superficial é uma ferramenta comum e um método indireto para monitorar a produção de biossurfactantes. À medida que o micro-organismo cresce, ele

sintetiza o biossurfactante e este metabólito é lançado ao caldo metabólico, reduzindo a tensão superficial.

A tensão superficial foi medida no tensiômetro modelo Kruss (K-6, Alemanha), que utiliza o método do anel (Du Noüy). As análises foram realizadas com os extratos livres de células, a uma temperatura de 25° C. A cada início das análises, o anel foi esterilizado por flambagem em bico de Bunsen e calibrado verificando a tensão superficial da água destilada, cujo valor é de aproximadamente 72,8 mN/m.

Foram realizadas três medidas da tensão superficial, sendo considerada a média aritmética dos resultados (PARASZKIEWICZ, KANWAL, DŁUGONSKI, 2001; JACKISCH-MATSUURA et al., 2014).

#### **5.6.8 Avaliação do efeito do pH na produção de biossurfactantes pelo isolado bacteriano**

Para avaliação do efeito do pH na produção de biossurfactante, foi utilizado o meio de cultura líquido citado no item 5.6.4, com 10% de óleo diesel. O pH foi ajustado em 7, 8 e 9.

### **5.7 Condições de cultivo e isolamento do biossurfactante bacteriano**

Frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio de cultura foram incubados, em incubadora orbital a 150 rpm, em uma temperatura de 30° C, por 96 h.

O caldo de cultura foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 1, centrifugado a 16.192 x g por 10 minutos a 25 °C e filtrado em membrana com porosidade de 0,22 µm. Em seguida, foi extraído com clorofórmio: metanol.

#### **5.7.1 Extração com clorofórmio: metanol**

Para extração do biossurfactante do sobrenadante foi utilizado clorofórmio: metanol na proporção 2:1:3 (clorofórmio: metanol: sobrenadante). O extrato contendo o biossurfactante foi separado em funil de separação e o solvente foi evaporado em temperatura de 50 a 75° C em rota evaporador. A amostra obtida foi congelada e liofilizada.

### **5.7.2 Detecção do biossurfactante em extrato bruto por Cromatografia em Camada Delgada**

Para a realização da corrida cromatográfica, foram utilizados 2,5 mg do extrato bruto dissolvidos em 100 µL de metanol. Sendo 10 µL da solução foi aplicada em placa de sílica gel 60 Merck (JACKISCH-MATSUURA et al., 2014). A placa foi eluída por 30 minutos com clorofórmio : metanol (1:1). Foram utilizados como reveladores vapores de iodo para detectar a presença de lipídeos (NEERATI & YANAMALA, 2013), *spray* de Rodamina 6G (0,005%) visualizada sob lâmpada UV (HOROWITZ, GILBERT, GRIFFIN, 1990), com modificações e ácido sulfúrico 6N com aquecimento a 100° C para verificar a presença de aminoácidos e outros compostos orgânicos (DITTMER & LESTER, 1964).

### **5.7.3 Purificação dos extratos e isolamento dos biossurfactantes por meio de coluna cromatográfica**

Com o intuito de isolar compostos e proceder à identificação de substâncias presentes no extrato de bactérias ou fungo, foi preparada uma coluna cromatográfica com 20 cm de altura. Foram adicionados 54 g de sílica gel 60 Merck, em seguida foi adicionado 250 mg do extrato liofilizado. A coluna foi eluída com clorofórmio:metanol em diferentes proporções (2:1, 1:1, 1:2 v/v) conforme Silva et al., (2014), com modificações. Em seguida as frações foram agrupadas por semelhanças após aplicação do revelador e visualização com lâmpadas UV.

As amostras foram coletadas em recipientes de vidro “tipo penicilina” conforme cada ciclo de arraste. Ao final de todos os ciclos foi realizado novamente o procedimento descrito no item 5.7.2 com unificação das frações semelhantes por meio do revelador Rodamina 6G e radiações em UV de 256 nm e 365 nm.

As frações obtidas foram mantidas sob refrigeração a 4 °C e posteriormente foram utilizadas nos testes subsequentes.

### **5.7.4 Redução da Tensão Superficial em relação aos surfactantes sintéticos comerciais**

Foram testadas as massas mais representativas das diferentes frações. A avaliação foi realizada por meio da medida de tensão superficial.



As amostras nas concentrações de 205, 358; 916, 135, 131,5 mg/L. foram dissolvidas em 20 mL de água destilada. A análise foi feita em tensiômetro Krüss pelo método do anel de Du Noüy, utilizando-se 20 mL de cada solução a 25 °C. Os surfactantes químicos SDS (Sódio Dodecil Sulfato) e Tween 80 foram utilizados na comparação com o biossurfactante bacteriano produzido.

#### **5.7.4 Caracterização química dos biossurfactantes produzidos por *Microbacterium* sp.**

A caracterização química dos compostos secundários, foram realizadas em parceria com o Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA.

##### **5.7.4.1 Espectroscopia no infravermelho (FT-IR)**

A análise de grupos funcionais característicos de agentes surfactantes foi realizada por espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros de FTIR foram obtidos utilizando o espectrômetro FTLA 2000-104 da ABB Bomem, a faixa espectral observada foi de 4000 a 400 nm utilizando pastilhas de KBr.

##### **5.7.4.2 Cromatografia líquida acoplada a Espectrômetro de Massas (UFLC/MS)**

As análises foram realizadas através de um sistema de Cromatografia Líquida Ultra rápida (Shimadzu) acoplada a Espectrômetro de massas (MicroTOF QII da Bruker), espectrômetro equipado com uma fonte de ESI padrão. Sua tensão capilar, e energia de colisão de íons foram 4500 V e 650 Vpp, respectivamente.

##### **5.7.4.3 Ressonância magnética nuclear (RMN<sup>1</sup>H)**

As amostras foram analisadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN<sup>1</sup>H), por solubilizadas em metanol deuterado. Os espectros foram obtidos em um equipamento Inova 500 da Varian, operando em uma frequência de 500 MHz.

### 5.8 Teste de citotoxicidade utilizando células padrão

O teste de citotoxicidade foi realizado para os extratos obtidos da bactéria selecionada para produção de biossurfactantes.

**Cultura de células:** Diferentes culturas de células MFC7, SKMELL#, HCT116, MRC-5 (fibroblastos humanos) foram obtidas a partir do banco de células do Rio de Janeiro, Brasil e foram mantidas em Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) que foi suplementado com soro fetal bovino a 10% (FBS), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 U/mL). As células foram incubadas a 37° C numa atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O ensaio de citotoxicidade foi determinada pelo método de azul de Alamar, conforme descrito por Nakayama et al., (1997). Resumidamente, as células aderentes ( $5 \times 10^3$  células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços de cultura de tecidos e expostas aos diferentes extratos (1,56 - 100 µg/mL) durante 72 h. Após a incubação, a solução de azul de Alamar (10 uL de 0,4% de Alamar Blue (resazurina em água) foi adicionada e as células foram incubadas durante 3 h a 37° C. A fluorescência foi medida (excitação a 545 nm e emissão a 595 nm) e expressa como uma porcentagem das células de controle após na fluorescência de fundo foi subtraído. Doxorrubicina (5 µg/mL) foi usado como um controle positivo da morte celular. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### 5.9 Teste de citotoxicidade utilizando *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade com *A. salina* foi realizado para os extratos fúngicos conforme Meyer (1982), modificado, preparando-se uma solução com sal marinho na concentração de 30 g.L<sup>-1</sup>. O pH foi ajustado para 8 com solução 0,1 mol/L<sup>-1</sup> de NaOH. Esta solução foi utilizada no preparo das demais diluições. Os ovos foram colocados para eclodir em solução salina por 48 h, com aeração constante a 25° C.

O teste foi realizado em placas multipoços, utilizando-se as concentrações de extrato livre de células: 100, 50, 25, 13, 7 e 3 µL; dez larvas de *A. salina*, sendo o volume final de 2000 µL. Após 24 h foi determinada a mortalidade com auxílio de microscópio estereoscópio binocular (Leica El 224). A CL<sub>50</sub> foi calculada conforme Finney (1947).

## **5.10 Metodologia utilizada para identificação molecular de fungos**

O DNA de fungos filamentosos, selecionados nos testes de biodegradabilidade, colapso da gota, emulsificação e tensão superficial, foi extraído utilizando o kit de extração plant/Fungi DNA isolation (#26200) da marca Norgen BiotecKCap, de acordo com as instruções do fabricante.

A concentração do DNA extraído foi estimada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8% acrescido do corante brometo de etídio. Foram aplicados no gel 2  $\mu$ L do DNA de cada amostra e 3  $\mu$ L de tampão 5X. Como padrões para a quantificação, foram utilizadas amostras de DNA com concentrações conhecidas (25, 50, 75 e 100 ng). Para a leitura da quantificação do DNA utilizou-se um fotodocumentador de imagens acoplado a uma fonte de luz ultravioleta (Biotech Image Master VDS modelo FTI-500, da Amersham Pharmacia Biotech).

### **5.10.1 Metodologia utilizada para amplificação das Regiões ITS1 e ITS4**

Para a reação de PCR das regiões ITS1 e ITS4 foi realizado um mix para 5  $\mu$ L DNA e 2  $\mu$ L de DNA.

O equipamento da marca Biocycler, foi utilizado para promover o anelamento dos primers com o ciclo:

- 1- Etapa inicial de desnaturação: 4 minutos a 94° C;
- 2- Desnaturação: 94° C por 1 minuto
- 3- Anelamento: 50° C por 1 minuto
- 4- Extensão 72° C por dois minutos
- 5- Repetição por 34 ciclos itens 2-4
- 6- 72° C por cinco minutos
- 7- -4 ° C por infinito

Os produtos finais foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídio como corante. Nos poços do gel foram aplicados 5  $\mu$ L do produto da PCR mais 3  $\mu$ L de tampão 5X e como padrão, foi utilizado DNA Ladder 1 Kb. A leitura da amplificação do DNA foi realizada por meio da intensidade de fluorescência em fotodocumentador.

### 5.10.2 Metodologia utilizada para a purificação da PCR

Para purificação da PCR utilizou-se as seguintes etapas de acordo com o método de Dunn & Blattner (1987). Para um determinado volume de uma reação de PCR, foi adicionado uma quantidade igual de Polietilenoglicol-PEG. A reação de PCR + PEG foi incubada a 37° C durante 15 minutos. Após isso o PCR + PEG foi centrifugado em alta velocidade (~ 2500 x rcf) durante 15 minutos à temperatura ambiente. O sedimento foi lavado com 125 µL de EtOH a 80% frio em cada tubo de PCR, novamente centrifugado por 2 minutos à temperatura ambiente a 1450 rcf. O sobrenadante foi descartado (de placas, inverter placa sobre um tecido, centrifugar a 140 rcf durante 1 minuto). Após esse procedimento o pellet foi secado para remover qualquer vestígio de EtOH. Em seguida o sedimento foi dissolvido em uma quantidade igual de água; conforme a reação de PCR inicial e agitado levemente e deixado descansar por alguns minutos para se certificar de que o DNA não se dissolva.

### 5.10.3 Reação de Sequenciamento

Para reação de sequenciamento, foram utilizadas de 2 µL de amostra de DNA amplificado e purificado, 5 µL de água Milli-Q, 0,5 µL do *primer* utilizado na amplificação, 0,5 µL de BigDye® e 2 µL de tampão 5X do kit de sequenciamento BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits. A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador da marca My Genie 96 Thermal Block, e a programação utilizada compreendeu 40 ciclos de (1) 1 minuto a 96° C, (2) 25 segundos a 95° C, (3) 2 minutos e 30 segundos a 60° C. Os dois *primers* utilizados no processo de amplificação, em ambos os sentidos, foram utilizados na reação de sequenciamento com o intuito de se obter as duas fitas do DNA.

### 5.10.4 Edição e alinhamento das sequências nucleotídicas

Após o término do sequenciamento nucleotídico das amostras, as sequências foram visualizadas por meio do programa BioEdit ou Mega 6.0 e procedeu-se à conferência e edição visual entre as sequências por comparação ao padrão apresentado no cromatograma de cada reação. A sequência foi analisada por similaridade com as depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## 5.11 Identificação molecular de bactérias

As bactérias selecionadas foram submetidas à identificação molecular pela extração, amplificação e sequenciamento da região 16S do DNA de acordo com as etapas descritas abaixo.

### 5.11.1 Extração de DNA

Foi realizada a extração do DNA genômico, segundo o método de Isola, De Vries, Chu (1994). Uma alçada de cada bactéria, individualmente, foi repicada para tubos de ensaio com roscas, contendo 4 mL de meio LB. foram incubadas a 30 °C sob agitação de 120 rpm, durante o período da noite. As células foram coletadas por meio de centrifugação e ressuspensas em 200 µL de solução TEN (Tris 50 mM, pH 8,0; EDTA 50 mM, pH 8,0; NaCl 100 mM). Foi acrescentado 20 µL de Lisozima (5 mg/mL) e incubado a 37° C, por 30 minutos. Foi acrescentado 0,1 V do surfactante SDS a 10% e 10 µL da enzima Proteinase K (10 mg/mL) e incubou-se a 37° C, por 15 minutos. Na sequência foi acrescentado 1 V de fenol hidratado e após centrifugação foi recuperada a fase aquosa. A esta foi adicionado 1 v de clorofane (fenol: clorofórmio, v/v) e novamente centrifugado e recuperado a fase aquosa. Finalmente foi adicionado 1 mL de clorofórmio e novamente procedeu-se a centrifugação e recuperação da fase aquosa. Foi realizada a precipitação das moléculas de ácido nucléico, utilizando-se 0,1 V de NaCl 3 M e 2 V de etanol a 100%. A ressuspensão do *pellet* foi realizada em 197 µL de Tampão R (Tris HCl 10 mM, pH 7,5 e EDTA a 1 mM ), acrescido de 3 µL de RNase.

### 5.11.2 Quantificação do DNA

A concentração do DNA extraído foi estimada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8% acrescido de brometo de etídio. Foram aplicados no gel 2 µL do DNA de cada amostra e 3 µL de tampão 5X. Como padrões para a quantificação, foram utilizadas amostras de DNA com concentrações conhecidas (25, 50, 75, e 100 ng). Para a leitura da quantificação do DNA utilizou-se um fotodocumentador de imagens acoplado a uma fonte de luz ultravioleta (Biotech Image Master VDS modelo FTI-500, da Amersham Pharmacia Biotech).

### 5.11.3 Amplificação do DNA pela reação de PCR

O DNA extraído e quantificado foi amplificado utilizando-se *primers* 530 F (5' - TGA CTG ACT GAG TGC CG - 3') e 1492 R (5' - TGA CTG ACT GAG AGC TCT ACC TTG TTA CGM YTT - 3') utilizados para amplificar a região do DNA responsável pela síntese da região ribossomal 16S. As reações foram realizadas em microtubos de 0,2 mL, aos quais foram adicionados 11,4 µL de água Milli-Q, 3,0 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2,5 µL de mix de dNTPs (2,5 mM), 2,5 µL de Tampão 10X, 1,0 µL de oligonucleotídeos F (5 pmol), 1,0 µL de oligonucleotídeos R (5 pmol), 0,6 de Taq DNA Polimerase (2,5 U/µL) e 3,0 µL do DNA genômico extraído (10 ng/µL) obtendo um volume final de 25 µL. Os tubos foram acondicionados em termociclador Mastercycler Gradient da Eppendorf. Foi utilizada para a reação de PCR a seguinte programação:

- 1- Etapa inicial de desnaturação: 4 minutos a 94° C
- 2- Desnaturação: 94° C por um minuto
- 3- Anelamento: 62° C por um minuto
- 4- Extensão: 72° C por dois minutos
- 5- Repetição por 35 ciclos itens 2-4
- 6- 72° C por cinco minutos
- 7- -4 ° C por infinito

Os produtos finais foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídio. Nos poços do gel foram aplicados 5 µL do produto da PCR mais 3 µL de tampão 5X e como padrão, foi utilizado DNA Ladder 1 Kb. A leitura da amplificação do DNA foi realizada por meio da intensidade de fluorescência em fotodocumentador.

### 5.11.4 Purificação do DNA amplificado

A purificação do produto amplificado foi realizada com o objetivo de eliminar os produtos não incorporados na região de amplificação. Foram utilizadas duas enzimas a exonuclease (EXO) e a fosfatase alcalina de camarão (SAP).

A reação se deu em microtubos de 0,2 mL, onde foi acrescentado 0,27 µL de EXO, 0,40 µL de SAP, 2,33 µL de água Milli-Q esterilizada e 10 µL do produto da PCR, para

um volume final de 13  $\mu\text{L}$ . As amostras foram acondicionadas em termociclador Mastercycler Gradient da Eppendorf. O programa foi utilizado com o seguinte perfil: 37° C por 30 minutos e 80° C por 15 minutos. Os produtos da PCR purificados foram novamente visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio conforme descrito anteriormente.

### **5.11.5 Reação de Sequenciamento**

Para reação de sequenciamento, foram utilizados 2  $\mu\text{L}$  de amostra de DNA amplificado e purificado, 5  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q, 0,5  $\mu\text{L}$  do *primer* utilizado na amplificação, 0,5  $\mu\text{L}$  de BigDye® e 2  $\mu\text{L}$  de tampão 5X do kit de sequenciamento BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits. A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador da marca My Genie 96 Thermal Block, e a programação utilizada compreendeu a 40 ciclos de (1) 1 minuto a 96° C, (2) 25 segundos a 95° C, (3) 2 minutos e 30 segundos a 60° C. Os dois *primers* que foram utilizados no processo de amplificação, foram utilizados na reação de sequenciamento, com o intuito de se obter as duas fitas do DNA.

### **5.11.6 Edição e alinhamento das sequências nucleotídicas**

Após o término do sequenciamento nucleotídico das amostras, as sequências foram visualizadas por meio do programa BioEdit ou Mega 6.0 e procedeu-se à conferência e edição visual entre as sequências por comparação ao padrão apresentado no cromatograma de cada reação. A sequência foi analisada por similaridade com as depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## **5.12 Screening enzimático dos isolados fúngicos**

As amostras selecionadas para testes enzimáticos foram aquelas que se mostraram eficientes no teste de biodegradação. Para os testes enzimáticos realizados, foram selecionadas enzimas de interesse comercial como: lacase, amilase, pectinase, protease e celulase. Foram realizadas análises estatísticas quantitativas e análise de componentes

principais – ACP de uma tabela do tipo amostras x variáveis quantitativas (enzimas). Cada um dos experimentos foi realizado em triplicata.

### 5.12.1 Avaliação de atividade da Lacase

Para avaliar a atividade de fenoloxidasas – Lacase, foi utilizado o protocolo descrito por Santos (2007), foram adicionados 20 g de ágar acrescido de 0,5% (p/v) de ácido gálico, 15 g de extrato de malte e 1 g de peptona em 1 L de água destilada. O ácido gálico foi homogeneizado em 125 mL de água destilada e autoclavado a 120° C, 1 atm, 10 min. Os demais reagentes foram solubilizados a pH 7 e autoclavados (120° C, 1 atm, 20 min). Após o resfriamento, o meio (45-50 °C) foi vertido em placas de Petri e, posteriormente inoculado com culturas jovens (24 h), incubados a 25 °C, por cinco dias no escuro.

A atividade da enzima lacase foi detectada pela formação de um halo marrom ao redor das colônias. A avaliação foi realizada, por meio da mensuração dos diâmetros perpendiculares da colônia mais o halo decorrente da atividade enzimática, obtendo-se as respectivas áreas.

Para a avaliação do índice de atividade enzimática, foi utilizada a fórmula a seguir:

$$\text{Atividade enzimática (I)} = \frac{\text{Diâmetro do halo (mm)}}{\text{Diâmetro da colônia (mm)}}$$

### 5.12.2 Avaliação da atividade da amilase

A atividade da amilase foi observada, a partir do cultivo em placas de Petri, contendo meio mínimo, o qual teve a glicose substituída por amido e pH 6,8. As colônias foram incubadas a 25° C sob uma foto período de 12 h. Após cinco dias de cultivo, foram então aplicados em cada placa 2 mL de solução lugol (5 g de KI, 1 g de iodo, 100 mL de água destilada), sobre a superfície do meio de cultura. Após 10 minutos, a solução lugol foi descartada e foi avaliado o halo de degradação, oriundo da atividade amilolítica, caracterizado pela formação de um halo claro circundado, por uma zona azulada ao redor da colônia (PEREIRA, 2009). A avaliação da produção do halo seguiu o mesmo procedimento para lacase.



### **5.12.3 Avaliação da Atividade de Celulase**

A atividade da celulase foi observada, a partir do cultivo em placas de Petri, contendo ágar carboximetilcelulose. As colônias foram incubadas por cinco dias a 25° C, no escuro e, em seguida, submetidas a choque térmico, por 16 h a 50° C. Após esse período, foi adicionado 10 mL de solução corante de vermelho congo (2,5 g/L) em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8. Após 30 minutos, a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M neste mesmo tampão, visando revelar o halo claro e estreito de degradação da celulose ao redor da colônia (PEREIRA, 2009). A avaliação da produção do halo seguiu o mesmo procedimento para lacase.

### **5.12.4 Avaliação da Atividade da Proteinase**

A atividade da proteinase foi avaliada, conforme a metodologia descrita por Hankin & Anagnostakis (1975), modificado. Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio solidificado específico com pH 6. A gelatina foi autoclavada, separadamente, e misturada ao meio antes de vertê-lo para as placas. As colônias foram incubadas por 48 h a 25° C, no escuro. Após este período, o halo, caracterizado por uma região amarelada ao redor da colônia contrastante com o vermelho presente na região em que não houve atividade proteolítica, foram revelados, por meio da aplicação de 10 mL de vermelho de metila (2%) em cada placa. A avaliação da produção do halo seguiu o mesmo procedimento para lacase.

### **5.12.5 Avaliação da Atividade de Pectinase**

A atividade de pectinase foi avaliada, conforme a metodologia descrita por Czapek, com modificações. Os isolados foram cultivados em meio de cultura específico e o meio foi ajustado para pH 6,8 com NaOH 10% antes de adicionar o ágar, em seguida, foi autoclavado por 20 minutos a 1 atm. A pectina cítrica foi dissolvida em 100 mL de água destilada, separadamente, do meio de cultura e foi acrescentada, após autoclavagem do meio, com o mesmo ainda quente.

As colônias foram incubadas, por cinco dias a 25° C, no escuro. Após esse período, o halo de degradação formado por uma região translúcida ao redor da colônia, foi revelado com aplicação de vermelho de metila (2%). A avaliação da produção do halo seguiu o mesmo procedimento para lacase.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Avaliação de fungos filamentosos para a produção de biossurfactantes

As amostras de fungos endofíticos isolados de espécies aquáticas *E. crassipes*, *I. calvescens* e *C. ligularis* foram reativadas com sucesso.

As amostras reativadas estavam preservadas em meio BDA, em tubos de ensaio, perfazendo um total de 25 isolados em triplicata. Desses 25 isolados, foram reativados com sucesso, 20 amostras, por meio de sucessivos repiques em placas de Petri 9X8. A técnica de preservação a qual os mesmos estavam submetidos assegurou a reativação da maioria dos isolados. O método de preservação dos micro-organismos assegura a viabilidade, morfologia, fisiologia e genética, mantendo a cultura por longo tempo e todos com o mesmo princípio: retardar ou paralisar o metabolismo celular (LACAZ et al., 2002).

Coleções de culturas contribuem, diretamente, para o estudo da sistemática e da biodiversidade mundial, por manterem e preservarem culturas que são essenciais para estudos, representando uma importante fonte de recursos biológicos permitindo a condução de inúmeros trabalhos científicos e assegurando o sucesso de sua utilização em processos, principalmente, biotecnológicos (CANHOS, UMINO, MANFIO, 2006).

As amostras cultivadas em meio mineral Busnheel-Haas-BH + petróleo como fonte de carbono, que tiveram crescimento nos primeiros sete dias estão em destaque na (Figura 6), onde visualmente observa-se crescimento da massa micelial a partir dos fracos da esquerda para a direita.



**Figura 6.** Crescimento de fungos filamentosos em meio BH + petróleo. Como controle, foi utilizado o meio BH + petróleo, sem o fungo

Pelos dados da Tabela 5, pode-se notar que a maioria dos isolados cresceram ao longo dos primeiros sete dias, pois observou-se o aparecimento de massa micelial e emulsão do petróleo em alguns dos isolados. Após os sete dias o crescimento tornou-se mais lento, talvez este fato esteja relacionado à diminuição da fonte de carbono no experimento em questão, consumido pelos micro-organismos, conforme a sua adaptação ao meio durante o período de observação.

Dentre as 20 amostras testadas, 15 apresentaram crescimento no meio utilizado. As amostras ou isolados, com os seus respectivos códigos (S31, S05, S24, S42, S25, S33, S12, S32, 3B1, S41, S45 e S17) foram as que tiveram seu crescimento registrado, nos primeiros sete dias e depois por mais sete dias até o 21º dia. Os isolados S44, S36, S46, apresentaram crescimento lento em relação às outras amostras, com aparecimento micelial somente a partir do 14º dia.

O comportamento desses isolados que cresceram, neste experimento, pode ser analisado segundo Jacques et al. (2007), onde para este, tanto fungos quanto bactérias possuem papel de biodegradadores de hidrocarbonetos. Os micro-organismos que apresentam sucesso no processo de degradação desses compostos devem ter em sua

maquinaria celular a produção de enzimas, para utilizar as complexas moléculas do petróleo em intermediários comuns de suas rotas metabólicas. Neste caso os fungos teriam duas rotas metabólicas uma não-lignolítica e a lignolítica; a exemplo dos fungos da espécie *Cunninghamella elegans*, e o fungo *Pleurotus ostreatus*, respectivamente (JACQUES et al., 2007). Oliveira et al. (2008) destacou que os fungos podem ser uma opção na degradação de compostos poluentes derivados do petróleo, uma vez que podem metabolizar esses resíduos.

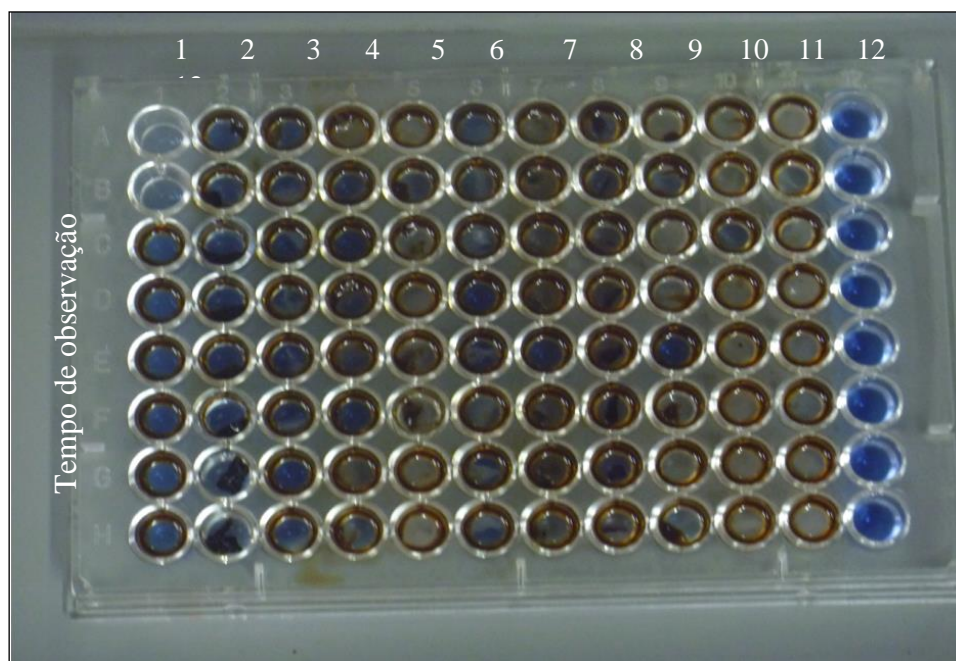
Para Silva & Espósito, (2004) a capacidade de adaptação dos fungos deve-se ao seu metabolismo na utilização de diferentes fontes de carbono e energia para a sua sobrevivência, esta capacidade metabólica está associada à produção de uma diversidade de enzimas intra e extracelulares, não específicas, capazes de degradar uma série de compostos, inclusive petróleo. Carneiro & Lucas, (2010), corroboraram com essa visão em um importante trabalho sobre biorremediação, utilizando micro-organismos, na metabolização de vários compostos tóxicos, dentre eles o petróleo.

**Tabela 5** Crescimento de amostras de fungos filamentosos em meio BH (Bushnell-Haas) + petróleo

Isolados	7 dias	14 dias	23 dias
S 14	-	-	-
S 44	-	+	+
S 31	+	+	+
S 05	+	+	+
S 36	-	+	+
S 24	+	+	+
S 46	-	+	+
S 42	+	+	+
S 25	+	+	+
S 33	+	+	+
S 12	+	+	+
S 32	+	+	+
3B1	+	+	+
S 50	-	-	-
S 51	+	+	+
S 45	+	+	+
S 02	-	-	-
S 53	-	-	-
S 23	-	-	-
S17	+	+	+

**Legenda:** (-) negativo = sem crescimento / (+) positivo = crescimento, como controle foi utilizado o meio BH+petróleo, porém sem os isolados

Os isolados que cresceram em BH + petróleo, foram utilizados frente ao Indofenol + petróleo, como única fonte de carbono (Figura 7).



**Figura 7.** Amostras de fungos filamentosos em placa multi-poços de poliestireno, contendo (1) indofenol, petróleo e sem o fungo, (2-11) indofenol, petróleo e fungos, (12) controle com indofenol sem o petróleo, sem o fungo. Observar a descoloração do indofenol nas amostras de 2-11

Foram testadas amostras que cresceram em menor tempo, sendo que oito (S31, S36, S24, S46, S42, S33, S32, S51), promoveram a oxidação do DCPIP, após 24 h e 48 h de reação, os isolados S31, S33, S32 e o S51, promoveram a oxidação em 24 h, enquanto que os isolados S36, S24, S46, S42 promoveram oxidação do DCPIP em 48 h (Tabela 6). Oliveira et al., (2012) usaram da mesma forma indofenol para selecionar micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos, em testes usando gasolina e/ou óleo diesel e/ou querosene.

Maciel et al., (2013) em estudos realizados para seleção de micro-organismos para degradação de querosene, mostraram, que o potencial em degradar o combustível foi verificado pela oxidação do corante indicador 2,6 diclorofenol-indofenol, sendo os isolados responsáveis pela degradação identificados como: *Penicillium aurantiogriseum*, *P. corylophilum*, e *P. griseofulvum*.

Para Silva & Espósito (2004), a degradação de poluentes é realizada pelo sistema enzimático intracelular citocromo P 450 monooxigenase que transforma produtos solúveis em água em menos tóxicos, levando ao processo de detoxificação. Provavelmente essas

enzimas estão envolvidas nesse processo. Ainda para esses autores, fungos do gênero *Penicillium* e *Fusarium*, foram encontrados em solos contaminados por petróleo. Esses relatos coincidem com o presente trabalho onde o gênero *Fusarium* também foi identificado em plantas indicadoras de poluição.

Harms, Schlosser, Wick (2011) relataram que culturas do gênero *Rhizopus*, são potenciais degradadores de HPAs, isso pode explicar o comportamento dos isolados quanto ao crescimento no meio contendo petróleo ou diesel nesta pesquisa (Tabela 6).

**Tabela 6.** Testes de biodegradabilidade dos isolados, utilizando indofenol + petróleo

<b>Isolado</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
<b>S 44</b>	-	-
<b>S 31</b>	+	+
<b>S 05</b>	+ -	+ -
<b>S 36</b>	+	+
<b>S 24</b>	+	+
<b>S 46</b>	+	+
<b>S 42</b>	+	+
<b>S 33</b>	+	+
<b>S 12</b>	-	-
<b>S 32</b>	+	+
<b>3B1</b>	-	-
<b>S 51</b>	+	+
<b>S 45</b>	-	-

**Legenda:** (-) negativo / (+ -) pouca descoloração / (+) positivo = incolor. Como controle negativo foi utilizado o indofenol sem petróleo, e como controle positivo, foi utilizado o indofenol com petróleo sem amostras fúngicas

As amostras utilizadas nos testes, assemelham-se em relação ao tempo de oxidação do DCPIP com o trabalho de Maciel et al., (2013), que observaram o tempo de 14 e 25 h para as amostras que promoveram a descoloração do indofenol. Os isolados desta pesquisa promoveram descoloração em 24 h e em Luz et al., (2011), esse tempo de reação de oxidação do indofenol, foi de 96 h.

### **6.1.1 Identificação Molecular dos Isolados Fúngicos**

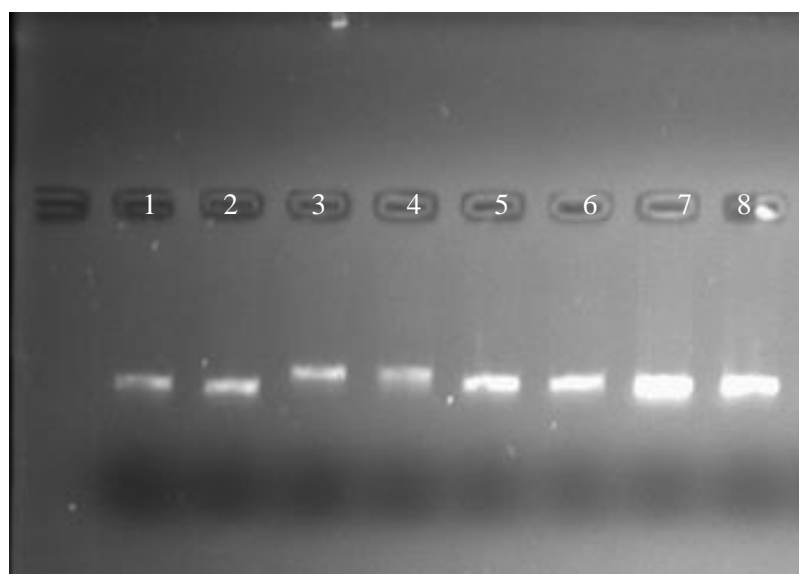
Oito fungos selecionados pelo crescimento no meio BH acrescido de petróleo foram identificados por meio do sequenciamento de parte do gene rDNA. Os fragmentos do gene rDNA contendo a região ITS1, ITS4 apresentaram entre 531 a 562 pb. Os fungos epifíticos S31 e S36 isolados de *C. ligularis* foram identificados como *Phoma* sp. e S24,

S25 como *Rhizopus oryzae*; S32 *Fusarium* sp.; S33 *Fusarium* sp., S42 *Fusarium* sp. Entre os endófitos provenientes de *E. crassipes*, S42 e S51 foram também identificados como *Fusarium* sp. O resultado das sequências mais relacionadas, seguido dos seus respectivos códigos de depósitos no *National Center for Biotechnology Information* – NCBI, está representado na Tabela 7.

O rDNA foi extraído, com auxílio de um kit comercial, foram submetidas à técnica de PCR, para amplificação da região de conservação ITS1 e ITS4. Pela revelação do gel, a partir da purificação da PCR, percebe-se que a maioria das amostras foram amplificadas (Figura 8).

Assim, do total de oito amostras, foram identificadas uma espécie *Rhizopus oryzae* e sete gêneros respectivamente, sendo que a maioria pertence ao gênero *Fusarium* com cinco representantes, e um gênero *Phoma* segundo as comparações feitas com banco de dados do NCBI.

Os resultados desta pesquisa indicam que há predominância do gênero *Fusarium* isolado de macrófitas aquáticas coletadas em ambientes com histórico de poluição em por hidrocarbonetos. Bhardwaj et al., (2015) relataram a presença destes gêneros em solos contaminados por hidrocarbonetos, o que reforça a ideia de que esse gênero é frequentemente encontrado em ambientes impactados por hidrocarbonetos de petróleo.



**Figura 8.** Perfil eletroforético da purificação do PCR. As bandas de rDNA numeradas de 1 a 8 correspondem aos isolados fúngicos.

**Tabela 7.** Identificação molecular dos fungos endofíticos e epifíticos isolados de macrófitas do rio Negro-Amazonas/Brasil, com os respectivos códigos de depósito no NCBI (National Center for Biotechnology Information)

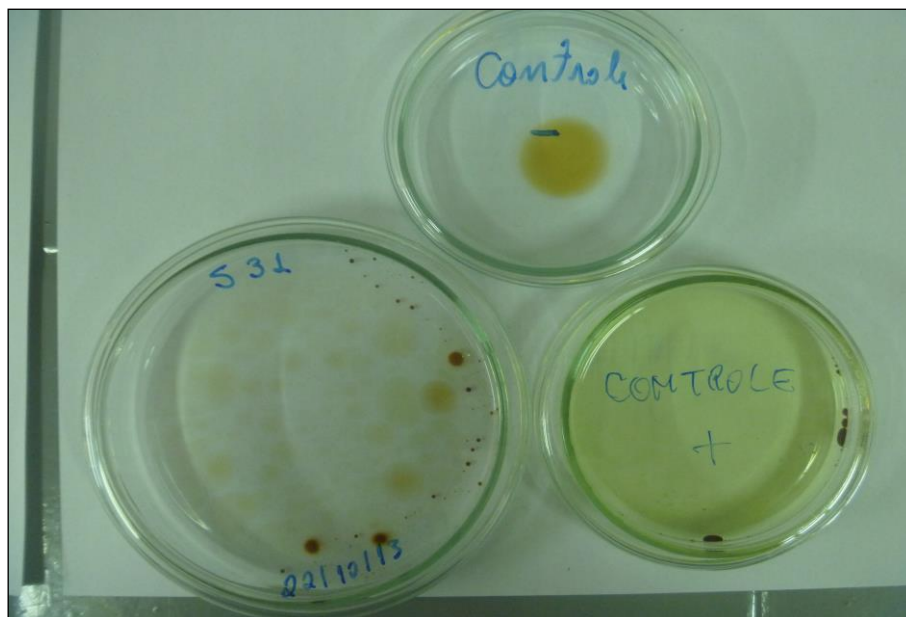
Iso*	Micro-organismos	Códigos no NCBI	Hospedeiros	Endo.*	Epi.*	Id.*(%)
S24	<i>Rhizopus oryzae</i>	KU948381	<i>Cyperus ligularis</i>		X	99
S31	<i>Phoma</i> sp.	KU948382	<i>C. ligularis</i>		X	100
S32	<i>Fusarium</i> sp.	KU948385	<i>Eichhornia crassipes</i>		X	99
S33	<i>Fusarium</i> sp.	KU948386	<i>C. ligularis</i>		X	98
S36	<i>Phoma</i> sp.	LT55522. 8	<i>C. ligularis</i>		X	100
S42	<i>Fusarium</i> sp.	KU948384	<i>C. ligularis</i>		X	99
S46	<i>Fusarium</i> sp.	KU948383	<i>C. ligularis</i>	X		99
S51	<i>Fusarium</i> sp.	LT555229	<i>E. crassipes</i>	X		97

\*Iso = Isolado; Endo = Endofítico; Epi = Epifítico; Id = Identidade

### 6.1.2 Teste seletivo do colapso da gota de petróleo

Oito (8) amostras que tiveram sucesso na descoloração do indofenol (DCPIP), foram utilizadas no teste do colapso da gota de petróleo, para evidenciar a produção de biossurfactantes. Percebeu-se que o extrato fúngico de dois isolados S31 e S42 promoveram a dispersão da gota de petróleo em menor tempo o isolado S31 foi eficiente, pois formou colapso da gota de petróleo instantaneamente mantendo a dispersão da gota de petróleo até o final do experimento (Figura 9).





**Figura 9.** Teste do colapso da gota em placas de petri. Observar a dispersão da gota de petróleo em 0 na placa com o extrato do isolado (S31) quando comparado com o detergente comercial usando como controle positivo

A amostra S42 apresentou colapso a partir de 1 minuto, após a aplicação da gota de petróleo, as demais amostras formaram pouco ou nenhum colapso (Tabela 8).

Haasanshahian, Giti, Simone, (2012) avaliaram qualitativamente a produção de surfactantes em *P. aeruginosa*, e em consórcio de diferentes micro-organismos para evidenciar a produção de biosurfactantes, a partir da precipitação de uma gota de petróleo com uma quantidade de extrato, semelhante aos utilizados na presente pesquisa.

Paraszkiewicz, Kanwal, Długonski, (2001); Luna, Sarubbo, Campos-Takaki, (2006); Batista, (2009) e mais recentemente Jackisch-Matsuura et al., (2014) realizaram testes semelhantes para a seleção e produção de biosurfactantes a partir de bactérias e fungos filamentosos com o intuito de prospectar micro-organismos produtores de biosurfactantes.

Kitamoto et al., (2001) em trabalho realizado com *Pseudozyma antarctica* (*Candida*), utilizaram em seu experimento diferentes n-alcanos como fonte de carbono e na ocasião verificou que estes organismos passaram a converter esses compostos em um biosurfactante da classe dos glicolípios, identificado como mannosylerythritol (MEL).

No entanto para Jain et al. (1991) é necessário realizar testes de tensão superficial, pois estes possuem uma maior correlação, com os do colapso da gota, pois dependendo da espécie podem apresentar uma ou outra característica, ou às vezes as duas. Bento,

Camargo, Gaylarde (2008) corroboram com essa ideia, pois este fato pode estar relacionado ao peso molecular do biossurfactante produzido pelo micro-organismo. Pinto (2008) mostrou que a produção de biossurfactante pela bactéria *Corynebacterium aquaticum* apresentaram menores tensões e maiores atividades emulsificantes ao contrário do que foi observado para o fungo *Aspergillus fumigatus*. Portanto percebe-se que a confirmação ou não dessa correlação surfactante e bioemulsificantes, necessita de confirmação por meio do teste de tensão superficial.

**Tabela 8.** Seleção de fungos endofíticos e epifíticos isolados de macrófitas do rio Negro – Amazonas/Brasil para produção de biossurfactantes por meio de diferentes parâmetros de avaliação.

Isolados	Colapso da gota						Índice de emulsificação $H_u/E_{24}$	Tensão superficial
	0	1 min	5 min	30 min	1h	72h		
<i>Phoma</i> sp. (S31)	+	+	+	+	+	+	1,5 cm/52 %	51,03 mN/m
<i>Fusarium</i> sp. (S51)	-	-	-	+	+	+	0,7 cm/38 %	-
<i>Phoma</i> sp.	-	-	±	±	±	±	0	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	-	-	±	±	±	±	0	-
<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	0	-
<i>Fusarium</i> sp.	-	+	+	+	+	+	0	-
<i>Fusarium</i> sp.	-	-	±	±	±	±	0	-
<i>Fusarium</i> sp.	-	±	±	±	±	±	0	-
Controle								
SDS	+	+	+	+	+	+	100 %	
BH+PS	-	-	-	-	-	-	0	53,03 mN/m
Água								71,26 mN/m

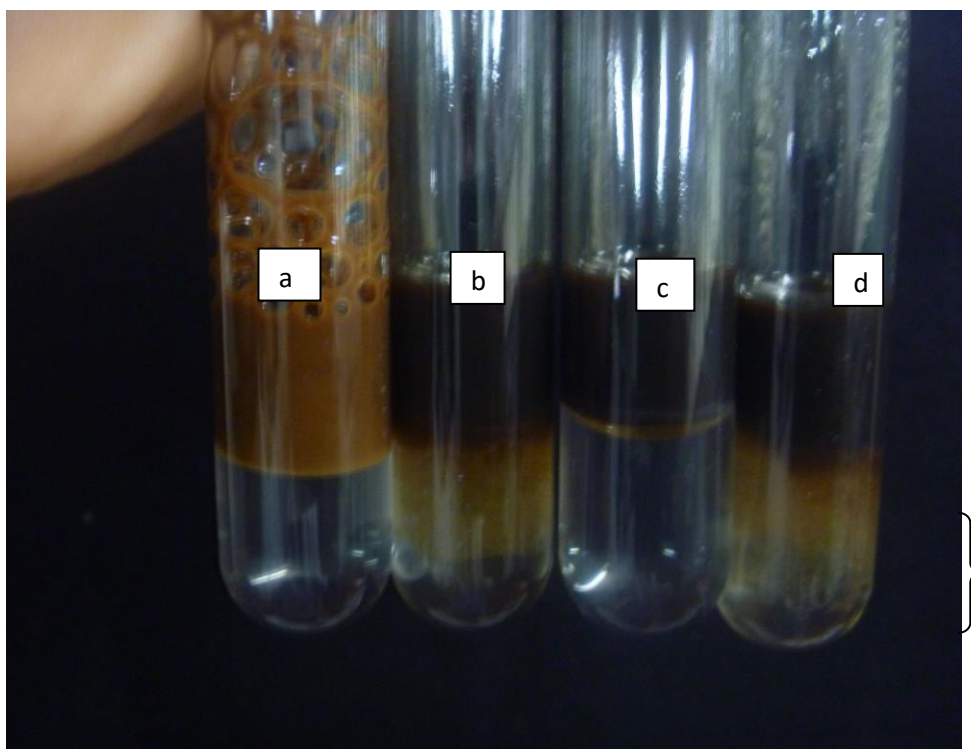
\*SDS = Dodecil Sulfato de Sódio foi usado como controle positivo e o meio BH+PS= Petróleo sem o fungo, foi usado como controle negativo.  $H_u$  = altura emulsificada,  $E_{24}$  = índice de emulsificação em 24 h

No teste de emulsificação verificou-se que apenas o fungo filamentoso *Phoma* sp. (S31) e o *Fusarium* sp. (S51) apresentaram atividade, o primeiro apresentou 1,5 cm ou 52 % de índice de emulsificação, o segundo apresentou 0,7 cm ou 38,8% de emulsificação, *Fusarium* sp. (S42) que havia dispersado a gota de petróleo, para este teste não apresentou atividade de emulsão conforme os dados da Tabela 8.

Por outro lado, como ambos os representantes pertencem ao Phylo Ascomycetes, Harms, Schlosser, Wick (2011), afirmaram que alguns representantes possuem habilidade em degradar diferentes tipos de derivados de petróleo como: óleos crus, diesel, cadeias de alcanos, benzenos, bifenil, clorofenóis, compostos PAHs, pesticidas TNT e tolueno.

Para Jackisch-Matsuura et al., (2014), a emulsão nos intervalos de 1 a 1,7 cm de altura é considerada uma emulsão moderada, enquanto que 1 cm é considerada baixa emulsão. Seguindo este parâmetro, a amostra S31 *Phoma* sp. foi a que mostrou melhor índice de emulsão enquanto que a amostra S51 foi considerado baixo quando comparados com os índices propostos.

O controle positivo usando detergente comercial, não se mostrou satisfatório para este teste, pois não houve diferença no padrão da emulsão como esperado. Provavelmente o detergente comercial possui maior capacidade na redução da tensão superficial do que propriamente a formação de emulsão, ao contrário do produto extraído do fungo *Phoma* sp. Assim passou-se a usar uma solução de SDS a 1 M (Figura 10).



**Figura 10.** Teste de emulsificação, utilizando petróleo e o extrato fúngico filtrado com membrana 0,45  $\mu\text{m}$ . Observar a formação da coluna de emulsificação em (b, d), em 24h. como controle positivo utilizou-se SDS (a), controle negativo sem extrato fúngico (c)

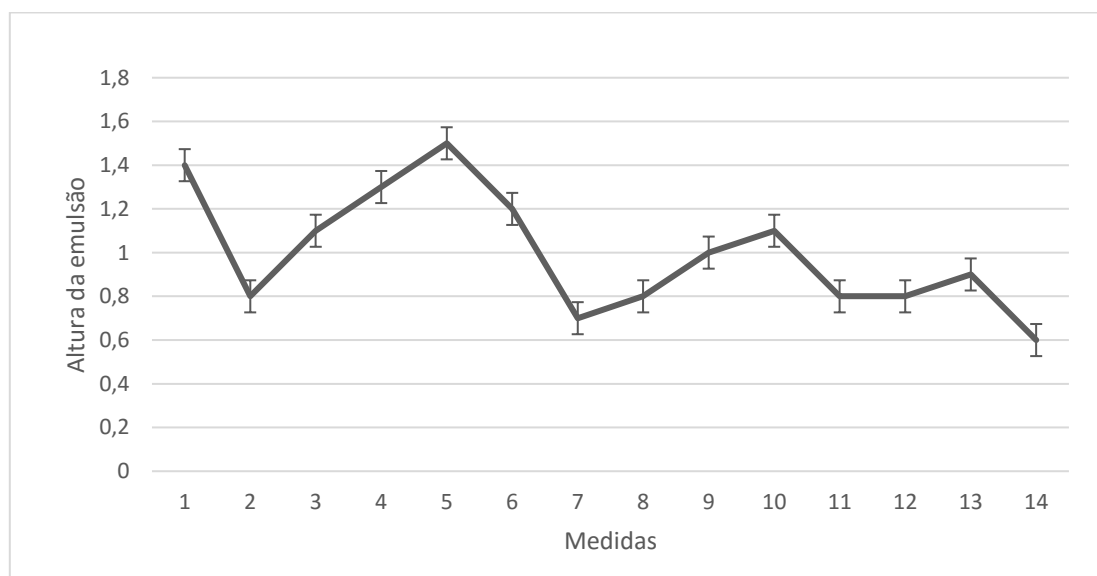
Paraszkiewicz; Kanwal e Długonski, (2001), em estudos com fungo *Curvularia lunata*, utilizou o método - óleo em água - para obter emulsão, do querosene. Isto demonstra que embora simples esse método permite a seleção de maneira satisfatória de micro-organismos produtores de biossurfactantes ou bioemulsificantes. Junior et al., (2012) destacaram que fungos do gênero *Phoma* são bons produtores de lacase,

enzima do grupo das fenoloxidas capazes de biodegradar compostos fenólicos e hidrocarbonetos; Carneiro & Lucas (2010) corrobora com essa visão em um importante trabalho sobre biorremediação, utilizando micro-organismos na metabolização de vários compostos tóxicos, dentre eles o petróleo.

Entre os oito fungos analisados apenas o *Phoma* sp. (S31), mostrou correlação nos diferentes testes realizados a fim de selecionar os produtores de biossurfactantes ou bioemulsificantes. Os demais isolados, embora tenham dispersado a gota de petróleo em diferentes tempos, não formaram emulsão acima de 1 cm, conforme convenção adotada.

Somente o *Phoma* sp. (S31) foi selecionado para o teste de tensão superficial, pois foi positivo no teste do colapso da gota em menor tempo e emulsificação acima de 1 cm. A diferença entre a tensão superficial do extrato fúngico e a tensão superficial do controle foi de 2 mN/m, porém em relação à água foi de 18,23 mN/m indicando possuir uma leve capacidade em romper a tensão superficial da água.

Para verificar a emulsificação do diesel, em relação ao tempo promovida pelo extrato fúngico, foi realizada uma curva de produção, que levou em consideração a altura emulsificada em relação ao crescimento do fungo (Figura 11).



**Figura 11.** Curva de produção de biossurfactante produzida pelo fungo epifítico *Phoma* sp. (S31) isolado de *Cyperus ligularis* L. no rio Negro – Amazonas/Brasil, ocorrendo em área contaminada com petróleo.

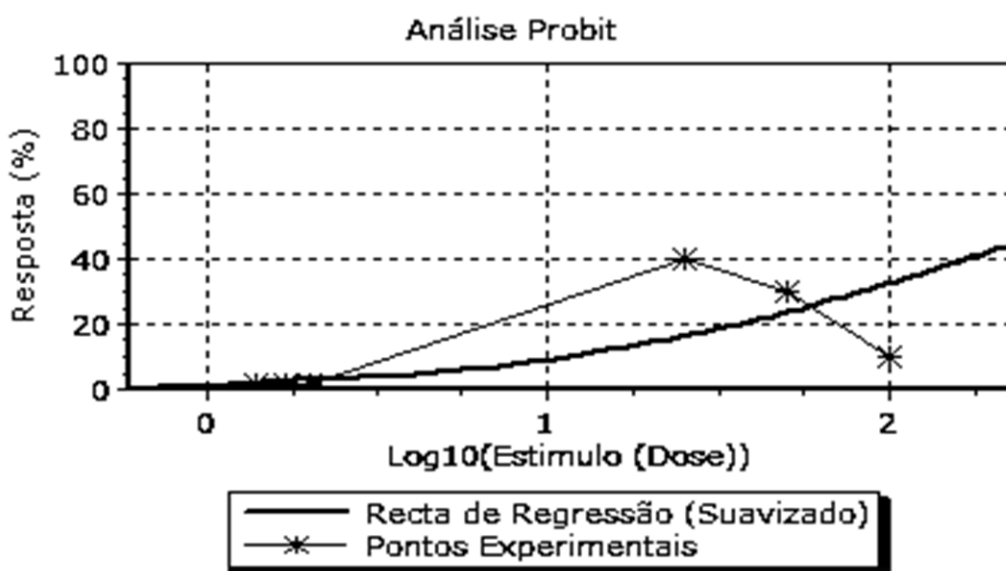
No décimo dia ocorreu a melhor atividade de produção do bioemulsificante pelo fungo *Phoma* sp. (S31). O índice de emulsificação observado na curva, variou de 0,6 a 1,5 cm. Tais medidas de emulsificação são comparáveis aos extratos de *Lactobacillus pentosus* utilizados na bioemulsificação do querosene, gasolina e octano (MOLDES et

al., 2013) e com *Fusarium proliferatum* para compostos n-dodecano (BHARDWAJ, CAMEOTRA, CHOPRA, 2015).

Herath et al., (2009) isolaram a partir de representantes de extratos do gênero *Phoma* de origem tropical, um composto lipopeptídico de estrutura cíclica, classificado pelos autores como Phomafungy, que se mostrou eficiente como antifúngico em diversos testes realizados. Com exceção do trabalho de Herath et al., (2009), não foram identificadas outras citações, do gênero *Phoma* como produtor de biosurfactante ou bioemulsificante. Isto abre uma oportunidade para realização de novos estudos para o isolado *Phoma* sp. (S31) ora identificado.

Para Roelants et al. (2014), a prospecção de novos biosurfactantes deve promover um estudo para esclarecer as vias genéticas da biossíntese destes compostos biológicos o que é também, interessante e indispensável para o ajuste e rearranjo destas vias biológicas, com o objetivo de obtenção de rendimentos mais elevados e uma mais extensa variedade estrutural

Pelo teste de toxicidade, o extrato aquoso da espécie produtora de bioemulsificante, mostrou ausência de toxicidade para as diferentes concentrações utilizadas (Figura 12). Tal resultado também foi observado por Decesaro et al. (2013), onde não encontraram atividade tóxica para bioemulsificantes de fungos ou bactérias testadas em seu trabalho



**Figura 12.** Análise de *probit* das seis concentrações utilizadas 100, 50, 25, 13, 7 e 3  $\mu$ L do extrato fúngico *Phoma* sp. (S31) livre de células.

## 6.2 Seleção de bactérias endofíticas para a produção de biossurfactantes

Os isolados foram selecionados utilizando-se meio BH + petróleo por um total de nove dias. Foram avaliados 41 isolados bacterianos com intuito de selecionar os melhores produtores de biossurfactantes. Na Tabela 9, estão sumarizados os dados com as bactérias que tiveram crescimento no meio utilizado.

Do total de 41 isolados 8,0 % mostraram resultados considerados muito bom, ou seja, turvaram o meio em menor tempo, 18,4% considerados bons e 18,4% considerados como pouca turvação e 55,2% sem crescimento. Foram realizados testes de biodegradabilidade, colapso da gota e emulsificação, com todos os isolados que turvaram o meio em menor tempo. Batista (2009), por meio deste experimento selecionou isolados com o intuito de prospectar bactérias para a produção de biossurfactantes

**Tabela 9.** Seleção dos isolados bacterianos, utilizando indofenol + petróleo.

Crescimento bacteriano	Percentual de amostras que turvaram o meio
Muito bom	8.0%
Bom	18.4%
Pouco	18.4%
Sem crescimento	55.2%
Total = 41 isolados	100%

(Muito bom): significa que houve uma maior turvação pelas bactérias, (Bom): turvação intermediária (Pouco): pouca diferença entre os controles utilizados.

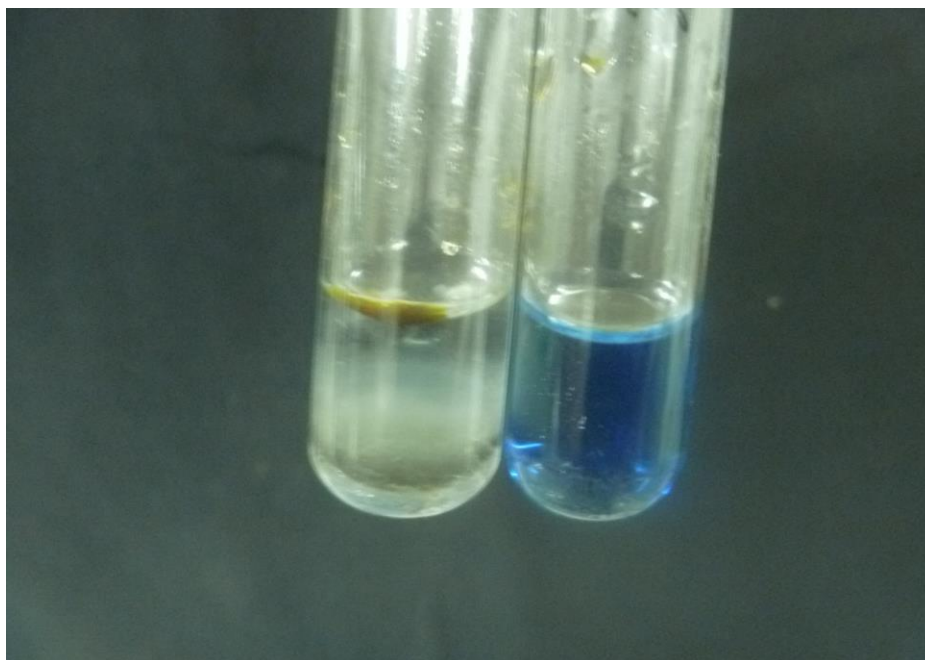
O aspecto turvo do meio utilizado indica que houve provável produção de biossurfactantes na presença dos isolados (Figura 13).



**Figura 13.** Teste de seleção de micro-organismos produtores de biossurfactantes utilizando-se o meio BH + petróleo e isolados bacterianos. Como controle foi utilizado meio BH + petróleo, sem os isolados.

Os micro-organismos que turvaram o meio em menor tempo e considerados muito bons foram submetidos ao teste de biodegradação por meio da descoloração do 2,6 Dicloro Fenol Indofenol (DCPIP). As bactérias selecionadas mostraram potencial por meio deste teste, pois em menos de 24h descoloriram o indofenol. Por outro lado, os isolados M87 e M111 descoloriram instantaneamente o indofenol, como foi verificado (Figura 14). Embora os fungos sejam bons degradadores até melhores que bactérias segundo Harmes (2011), foi percebido nesta pesquisa, que os isolados bacterianos mostraram possuir este potencial nesse mesmo sentido.

Jackisch-Matsuura et al., (2014) utilizaram o diesel como fonte de carbono para selecionar bactérias e fungos da região Amazônica. Pela quantidade de micro-organismos analisados, percebe-se que nem sempre aqueles que crescem tanto em petróleo como em diesel, produzem biossurfactantes, conforme dados apresentados pela autora e confirmados com os resultados desta pesquisa, onde de 60 isolados testados apenas três mostraram-se bons produtores de biossurfactantes ou bioemulsificantes.

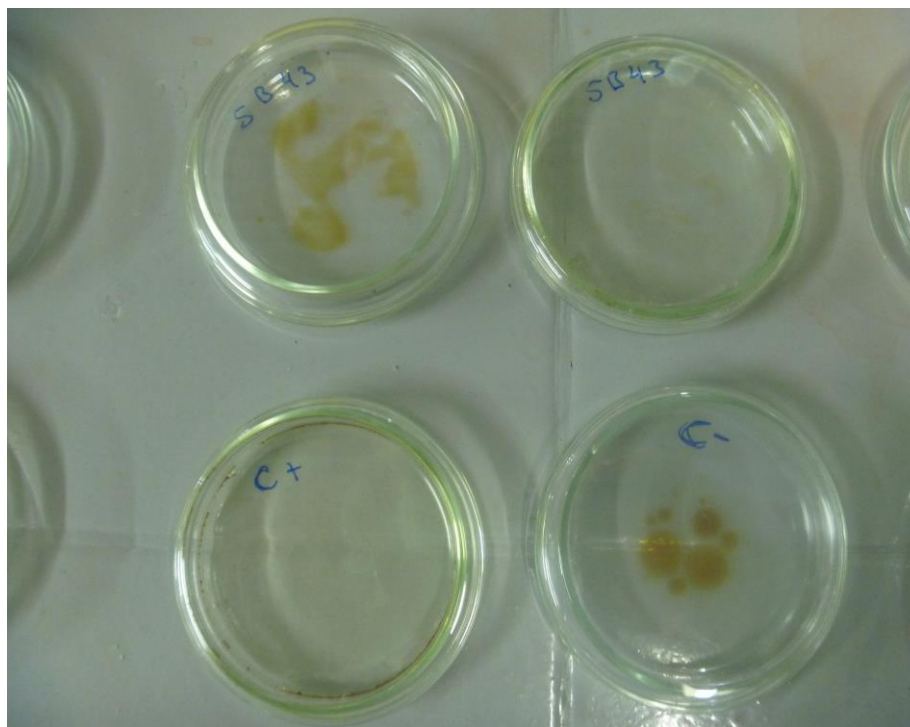


**Figura 14.** Teste utilizando o 2,6 Diclorofenol indofenol. No tubo incolor mostra a ação da bactéria. O tubo com liquido em azul corresponde ao indofenol sem bactéria, utilizado como controle.

Os isolados M111, M87 e SB43 (Figura 12) tiveram seus extratos avaliados quanto a capacidade de dispersar a gota de petróleo, nos tempos 0, 1, 5, 30 min, 1 e 72 h.

Observou-se nestes isolados a ação em dispersar a gota de óleo a partir de 1min, o isolado SB43 e M87 mantiveram a dispersão até o final da observação do experimento (Figura 15), enquanto que os isolados M111 algumas gotículas se reagruparam para esse mesmo tempo de observação. Esta ação deve estar relacionada a baixa produção de moléculas biossurfactantes relacionados a emulsificação





**Figura 15.** Teste do colapso da gota de petróleo para seleção de micro-organismos produtores de biossurfactantes.

Os isolados bacterianos selecionados por meio do teste de colapso da gota, tiveram seus extratos avaliados quanto à capacidade de emulsificação do diesel (Tabela 11). Liu et al., (2014), trabalhando com linhagens de bacterianas isoladas de solo contaminado por petróleo, empregou o método de emulsificação e colapso da gota, para selecionar com sucesso ao menos três cepas bacteriana para a produção de surfactantes. Esse método foi empregado também nos trabalhos de Batista (2009), Jackisch-Matsuura et al., (2014) com o intuito de selecionar s produtores de biosurfactantes.

**Tabela 10.** Principais bactérias selecionadas como produtora de biossurfactantes.

Isolados	Teste de Bushnell Haas+petróleo	Teste de DCPIP		Colapso da gota				Emulsão diesel	Tensão superficial
		24 h	48h	0 s	1 min	5 min	72 h	24h	
SB43	mb	+	+	-	+	+	+	1,2 cm	47,32 mN/m
M87	mb	+	+	-	+	+	+	1,7 cm	40,53 mN/m
M111	mb	+	+	-	-	+	±	0,5cm	32,97 mN/m
Controles									
BH+DS								2,0 cm	48,87 mN/m

Legenda: mb= muito bom. (-) negativo / (±) demorado colapso / (+) rápido colapso. Para controle negativo foi usado o extrato do meio BH + diesel, sem a bactéria, e como controle positivo foi usado o SDS na concentração de 1M. mN/m = milinilton/metro.

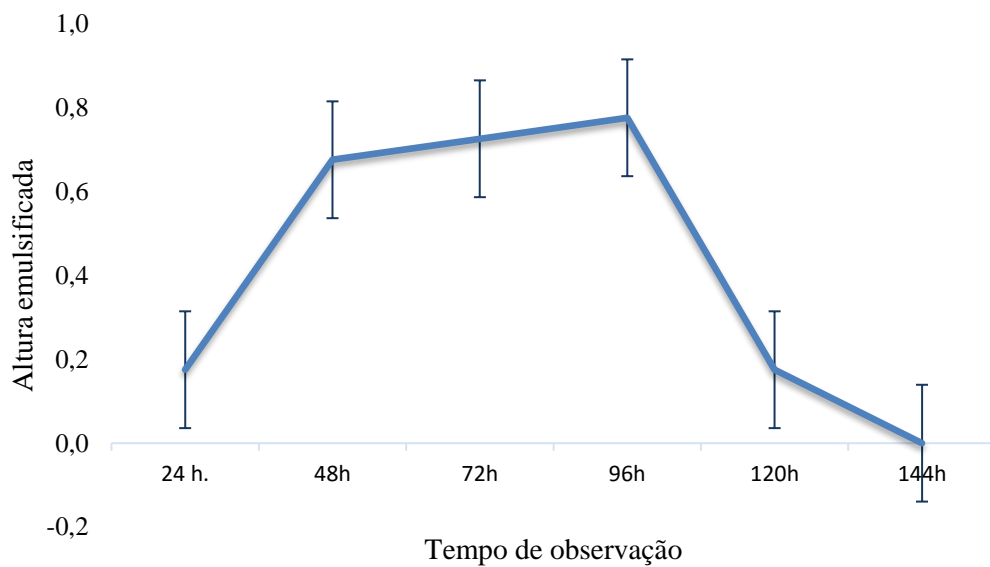
Pelos dados plotados na Tabela 11, observou-se que a emulsão do diesel teve resultado positivo para os isolados SB43 e M87, enquanto que para o isolado M111 praticamente, não se observou ação emulsificante. Interessante notar que, embora este isolado não tenha apresentado emulsão do diesel, percebeu-se sua ação em diminuir a tensão superficial da água, melhor do que observado para os dois primeiros. Os isolados SB43 e M87 provavelmente produzem biossurfactantes de baixo e alto peso molecular devido ao comportamento relacionado à formação de emulsão e diminuição ou não da tensão superficial, enquanto que o isolado M111 provavelmente produz biossurfactantes de baixo peso molecular o que explicaria a ausência de emulsão, porém apresenta a capacidade de diminuir a tensão superficial da água (BENTO; CAMARGO; GAYLARDE, 2008). Embora nem sempre haja correlação entre os testes seletivos para biossurfactantes, foi realizado um estudo quanto à produção de biossurfactantes ao longo do tempo, para assim decidir qual o melhor micro-organismo dentre os três selecionados, seguir com os estudos para produção e possível identificação química dos biossurfactantes produzidos.

Os isolados SB43, M111 e M87 selecionados, foram identificados molecularmente por meio de técnicas de biologia molecular pelo método de Sanger. As sequências editadas por meio do programa BioEdit, foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI. Pelos resultados das comparações, os isolados todos com 100% de similaridade foram definidos como: SB43 *Escherichia* sp., M87 *Microbacterium* sp. e M111 *Bacillus* sp.

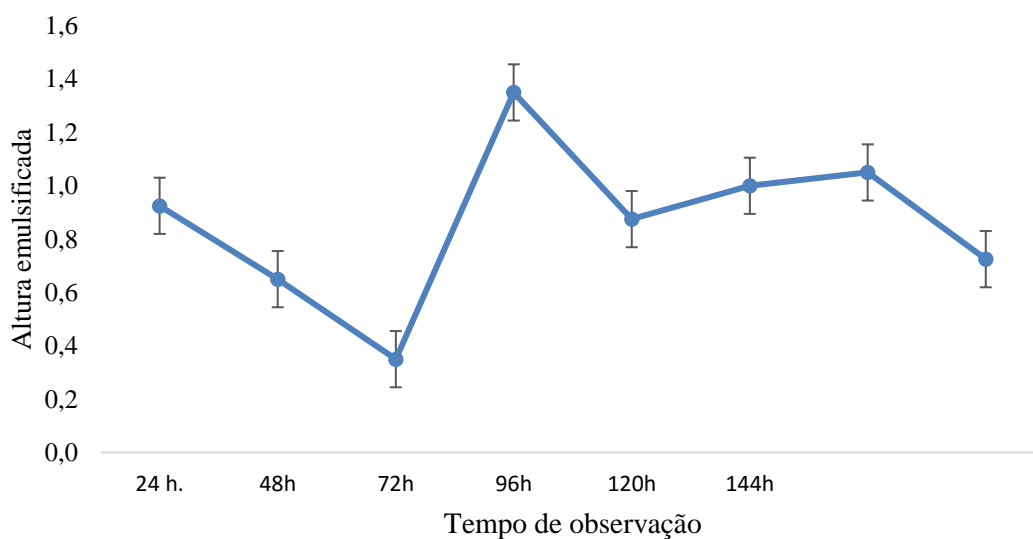
### **6.2.1 Curva de produção de biossurfactantes pelos isolados selecionados**

Os isolados foram submetidos a um estudo quanto à produção de biossurfactantes ao longo do tempo. Para isso foi realizada uma curva de produção. Este método foi utilizado por Krepsky et al. (2007); Bezerra et al., (2012) visando os mesmos objetivos do presente trabalho.

A cada 24 h foi retirada uma alíquota e medida a altura emulsificada do diesel e medida a altura emulsificada em centímetros. Cada isolado originou uma curva, com exceção do isolado M111 que não produziu emulsão durante o tempo total de observação.



**Figura 16.** Curva de produção de biosurfactante pelo isolado M87 *Microbacterium* sp.



**Figura 17.** Curva de produção de biosurfactante do isolado SB43 *Escherichia* sp.

Percebe-se em ambas as curvas que a produção se deu na fase estacionária, essa característica foi observada por Pinto, Martins, Costa (2009) em um estudo com diferentes micro-organismos de culturas mistas de *Corynebacterium aquaticum* e *Bacillus* sp. e cultura pura de *Bacillus subtilis*, demonstrou que, nestes casos a maioria dos biossurfactantes foram secretados na fase estacionária, comportamento observado para os isolados da presente pesquisa.

A curva do isolado M87 *Microbacterium* sp. indica um comportamento estável de produção ao contrário do isolado SB43 *Escherichia*. Por outro lado, provavelmente para o primeiro isolado houve uma melhor assimilação de hidrocarbonetos do diesel para produção de biossurfactantes, ao contrário do que se observa para o isolado SB43. O isolado M111 não produziu emulsão ao longo do tempo de observação, ao contrário do que foi verificado, para M87 e M111.

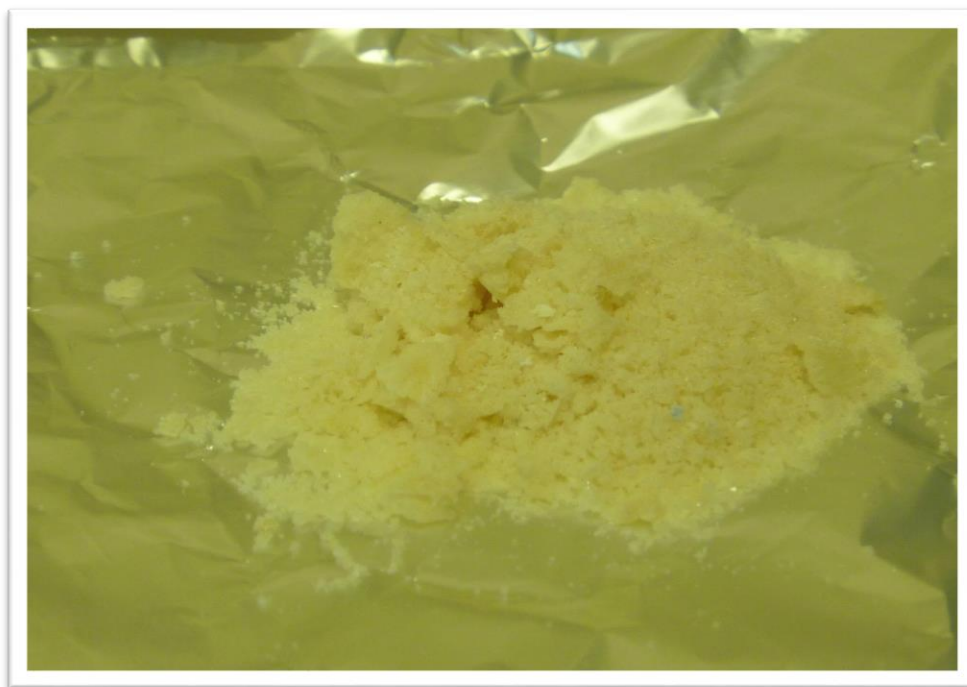
Pelo fato de apresentar maior correlação por meio dos testes seletivos realizados e manter uma produção estável na fase estacionária e ainda por possuir poucos relatos na literatura quanto à produção e identificação de biossurfactantes, o isolado M87 *Microbacterium* sp. foi selecionado para estudos, quanto à produção, isolamento e caracterização química de seus compostos.

### **6.3 Produção e isolamento de biossurfactantes produzido pela bactéria endofítica *Microbacterium* sp.**

A produção de biossurfactantes pelo isolado M87 *Microbacterium* sp. seguiu as condições estabelecidas anteriormente. O tempo de fermentação foi de 96 h estabelecido a partir da curva de produção.

O sobrenadante do meio fermentado usado para crescimento da bactéria foi submetido à extração com clorofórmio: metanol, observou-se a formação de duas fases distintas, sendo a fase do clorofórmio coletada e evaporada. Nesta pesquisa, diferente do que foi evidenciado por Jackisch-Matsuura (2004), não se verificou a formação de espumas na fase do clorofórmio. O rendimento do material após a liofilização foi de 3 g/L.

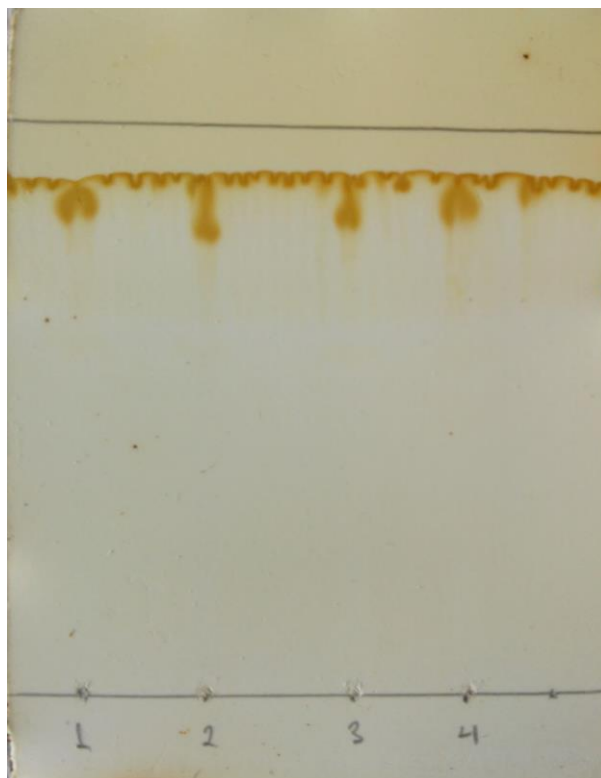
O biossurfactante após a liofilização apresentou coloração bege (Figura 18).



**Figura 18.** Extrato liofilizado produzido pelo isolado M87 *Microbacterium* sp.

Foi preparada uma solução de 2,5 mg de extrato bruto liofilizado em 100  $\mu\text{L}$  de metanol. Foi aplicado 10  $\mu\text{L}$  desta solução em placas de sílica gel a fim de identificar a presença de compostos relacionados aos lipídeos e aminoácidos, constituintes dos biossurfactantes.

A revelação por atmosfera de iodo; spray de rodamina 6G (Merck) e ácido sulfúrico 6N evidenciaram a presença de compostos orgânicos, provavelmente lipídeos e aminoácidos (Figura 19).



**Figura 19.** Placa cromatográfica da fração 1 evidenciando a presença de compostos orgânicos.

Para purificar o biossurfactante, foram utilizados 250 mg de extrato liofilizado em coluna cromatográfica. Do total de 75 coletas da coluna cromatográfica, foram obtidas 15 diferentes frações semelhantes por meio de cromatografia em camada delgada. Cada placa com seus respectivos “spots” foram revelados com rodamina 6G e visualizado em UV de 256 a 364 nm. As massas das referidas frações foram de 18 a 916 mg.

As cinco frações mais representativas foram submetidas ao teste de tensão superficial. O motivo pelo qual se escolheu as melhores frações, foi devido à diluição em água tornar aquelas com massa muito baixas, muito diluídas e devido a isso não se observar redução da tensão superficial esperada Tabela 11. Percebe-se pela tabela, que a fração 1 foi a que melhor reduziu a tensão superficial da água, o segundo melhor resultado foi observado para a fração 3, é possível que este fato esteja relacionado à concentração de compostos de baixa massa molar, nessas duas frações, uma vez que estes seriam responsáveis por essa característica (Bento, Camargo & Gaylarde 2008). Pode-se perceber ainda que com exceção da fração 4, todas as outras, reduziram a tensão superficial abaixo de 40 mN/m, indicando atividade biossurfactante, de acordo com os

trabalhos de (PARVIZ, AYATOLLAHIA, MOWLAA, 2015; LIU et al., 2014; JARA, ROSILEID, CAMPOS-TAKAKIC, 2013).

**Tabela 11.** Análise da tensão superficial de diferentes frações obtidas do extrato do isolado M87 *Microbacterium* sp.

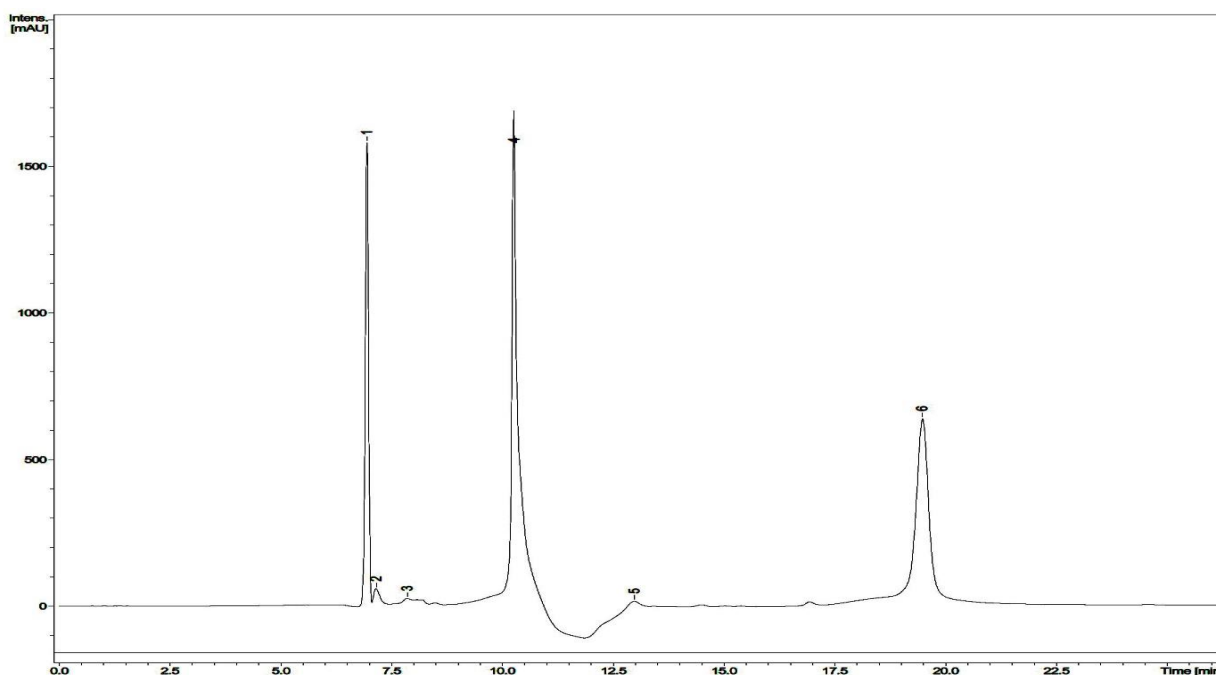
	Frações				
	1	2	3	4	5
Tensão	34,17 mN/m	35,85 mN/m	35,20 mN/m	53,92 mN/m	36,48 mN/m
Massas	205 mg	358 mg	916 mg	135 mg	144 mg
	Controles				
SDS	31,59 mN/m / 0,03453 µg				
Tween 80	39,79 mN/m / 0,03453 µg				

mN/m = miliNewton/metro.

## 6.7 Caracterização estrutural do biossurfactante produzido

A composição química do biossurfactante presente na fração (1) foi analisada por meio de três diferentes técnicas analíticas (HPLC/MS, RMN de  $^1\text{H}$ , FT-IR).

Pela análise da fração 1 em UFLC/MS, observa-se seis picos, sendo que os mais representativos são os picos 1 com 6,5 minutos de retenção, seguido, do pico 4 com 10,5 e o pico 6 com 19,5 minutos de retenção (Figura 20).



**Figura 20.** Análise da fração 1 por meio do HPLC/MS, mostrando os principais picos correspondentes as substâncias presentes.

**Tabela 12.** Caracterização química do biossurfactante produzido pela bactéria *Microbacterium* sp.

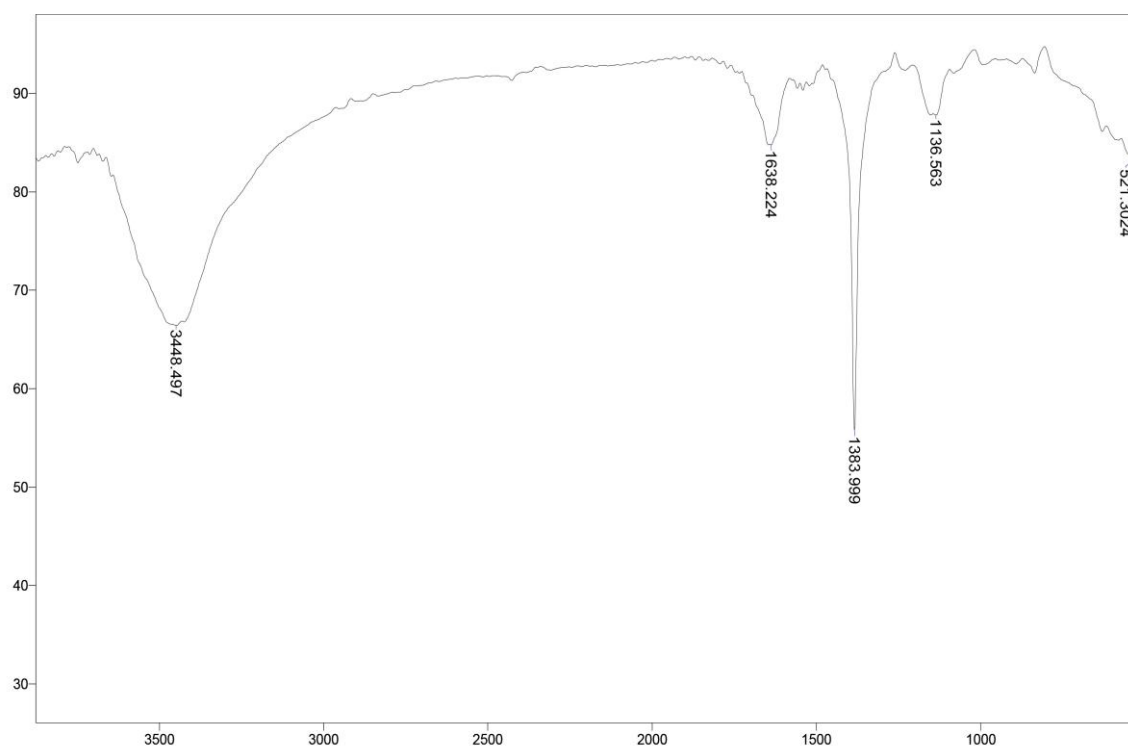
Picos	Peso molecular (m/z)	Estrutura química	Tempo de retenção (min.)
1	1106,8051	$C_{60}H_{114}O_{17}$	6,5
2 e 4	1133,8	$C_{69}H_{113}O_{12}$	6,5, 10,5
3,5 e 6	761,5944	$C_{39}H_{85}O_{13}$	7,5, 13, 19
-	465	$C_5H_5O_2$	-
-	339	-	-

Os dados fornecidos pela análise do HPLC/MS, plotados na Tabela 12, combinada com a Figura 20, indicam possíveis estruturas químicas com presença predominante de ligação carbono-hidrogênio ou carbono-oxigênio, formando uma longa cadeia carbônica, provavelmente formando lipídeos do tipo ácidos graxos. Estes dados puderam ser confirmados pelas técnicas de FT-IR e RMN.

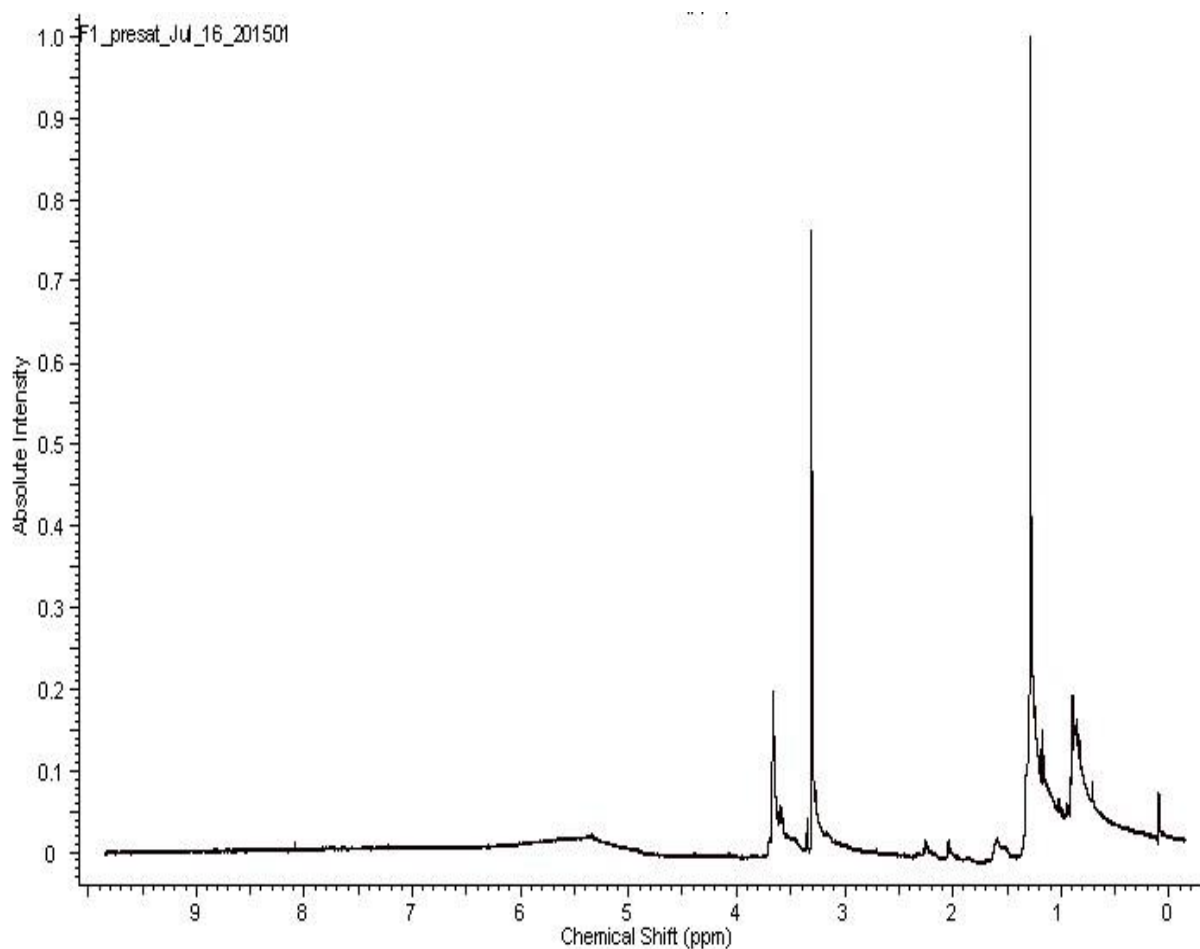
Observa-se no espectro de infravermelho (Figura 21), a presença de absorção em 1136  $cm^{-1}$  corresponde à região (C-H), seguida de 1383  $cm^{-1}$  correspondente região de compostos alifáticos (-CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>) e 1638  $cm^{-1}$  corresponde a ligação C=O, absorvância de 3448  $cm^{-1}$  representa o estiramento de ligação C-H ou estiramento de OH. Não se observou nesse espectro estiramento de N-H, o que nos faz pensar na ausência de resíduos



de peptídeos. Esses dados estão de acordo com o trabalho de Sousa et al., (2014) na caracterização de biossurfactantes de *B. subtilis*, notadamente no que diz respeito às regiões de ligação carbono-hidrogênio. Camacho-Chab et al. (2013) estudaram o gênero *Microbacterium* sp. isolado de ambiente marinho e comprovaram a presença de glicoproteínas capazes de emulsificar hidrocarbonetos aromáticos e óleos. A bactéria isolada do ambiente marinho difere da isolada no presente trabalho no que diz respeito às bandas de absorção obtidas por meio de FT-IR, provavelmente por se tratar de ambientes diferentes. É possível que o isolado do presente trabalho produza um composto distinto, porém com ações semelhantes no que diz respeito à emulsificação. Por outro lado, percebe-se que os micro-organismos provenientes de ambientes de áreas com histórico de contaminação por petróleo e seus derivados, possuem mecanismos fisiológicos que de fato, auxiliam na captação de hidrocarbonetos usados como fonte de carbono e podem transformar esses substratos em diversos subprodutos sendo um deles, os biossurfactantes, como ficou constatado nesta pesquisa.



**Figura 21.** Espectro de ressonância magnética com transformada de Fourier do biossurfactante produzido pela *Microbacterium* sp.



**Figura 22.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do biossurfactante produzido.

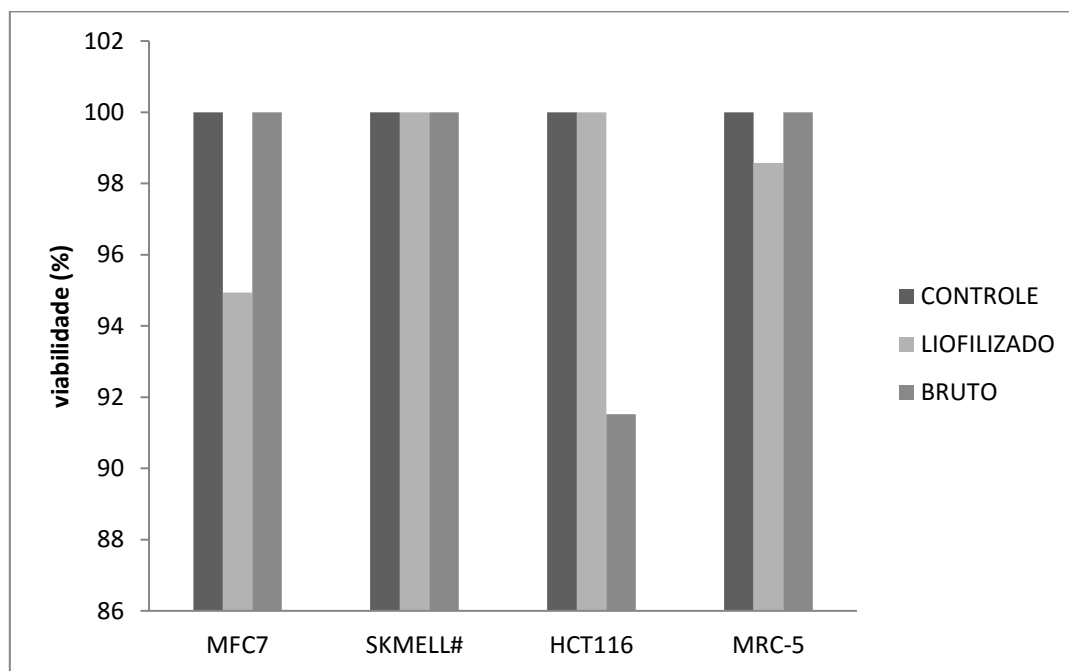
O espectro de hidrogênio (Figura 22) confirma a presença de ligação de hidrogênio ligados a carbono por meio dos deslocamentos em 3,66 ppm indicando a presença de estrutural de  $\text{CH}_3\text{O}$ , no deslocamento de 1,25-1,55 ppm indica a presença de grupos alifáticos  $\text{CH}_2$ , e em 5,3 ppm a presença de grupos CHO estes deslocamentos e a presença dos respectivos grupos estão de acordo com os trabalhos de (LIU et al., 2014; SOUZA et al., 2014; JARA, ROSILEID, CAMPOS-TAKAKIC, 2012).

É possível afirmar que, pelos deslocamentos químicos, o isolado M87, tenha uma estrutura carbônica semelhante ao biossurfactante produzido por *B. subtilis* frequentemente relatado como produtor de surfactina.

O biossurfactante presente na fração analisada provavelmente é do tipo ácido graxo, aniônico de cadeia longa, pois não foi evidenciada a presença de outras estruturas a não ser carbono e hidrogênio, por meio das diferentes técnicas utilizadas para a fração 1.

#### 6.4 Teste de citotoxicidade dos extratos da bactéria *Microbacterium* sp.

O teste realizado para medir o grau de toxicidade do extrato bacteriano liofilizado mostrou ausência de toxicidade para as concentrações utilizadas conforme os dados da Figura 23. As células permaneceram viáveis e não sofreram morte celular pelas concentrações utilizadas dos respectivos extratos utilizados.



**Figura 23.** Teste de citotoxicidade do extrato bruto e liofilizado da bactéria *Microbacterium* sp. utilizando-se diferentes linhagens do fibroblasto humano.

#### 6.5 Experimento para determinar o melhor pH para a produção de biossurfactantes do gênero *Microbacterium* selecionado.

Os extratos bacterianos com diferentes pHs foram avaliados por meio do teste de tensão superficial Tabela 13. Os extratos avaliados nestas condições conseguiram diminuir a tensão superficial da água quando comparado com a tensão da água destilada, porém quando comparados ao controle a redução foi pouco significativa. É possível que este não tenha afinidade na produção de biossurfactantes para esta faixa de pHs utilizada. É possível que a bactéria em estudo promova a produção de biossurfactantes em pHs abaixo de 7. Por outro lado, estes dados comparados ao pH 6,8 utilizado inicialmente, mostram diferença significativa no que diz respeito à redução da tensão superficial que foi de 40,53 mN/m.

**Tabela 13.** Tensão superficial (mN/m) do extrato crescido em diferentes pHs e tempo de fermentação para a produção de biossurfactantes do isolado M87.

	pH7				pH8			pH9	
48h	59,12	59,46	57,30	57,23	58,91	61,49	54,51	42,66	58,87
72h	59,56	59,08	62,58	58,69	59,65	53,51	56,18	57,31	58,53
96h	57,97	58,08	56,95	58,75	61,65	61,66	59,05	59,95	59,28
120h	61,43	53,62	58,52	58,77	58,13	53,73	60,43	59,79	57,56
Controle	48,78 mN/m				57,60 mN/m			47,86 mN/m	
Água destilada	71,21 mN/m								

mN/m = miliNewton/metro.

### 6.6 Produção de enzima de interesse comercial por fungos filamentosos.

Todas as oito amostras de fungos filamentosos utilizadas nos experimentos anteriores, foram utilizadas no teste qualitativo com o intuito de avaliar a capacidade de produção de diferentes enzimas.

A atividade enzimática de cada amostra foi estudada por meio do teste de fragmentos de colônia. Cada fragmento retirado da colônia teve um tamanho aproximado de cinco milímetros. As enzimas testadas por meio deste experimento foram: lacase, pectinase, amilase, proteinase e celulase.

Os resultados obtidos para avaliar a capacidade de produção enzimática extracelular para as oito amostras de fungos endofíticos e epifíticos, isolados de *Eichornia grassipes* e *Cyperus ligularis* estão sumarizados na Tabela 14.

Pelos dados apresentados, verificou-se que o teste para avaliar a produção de lacase, a amostra (S31) *Phoma* sp. apresentou índice enzimático de 1,04 cm. Para a pectinase três amostras (S36, S32, S42), tiveram seus índices registrados em 1,8 a 2,9 cm. Observa-se que todas as amostras apresentaram produção para amilase e proteinase, sendo os maiores índices para amilase observados para as amostras S33, S31, S36, S32, e para proteinase os melhores índices foram resgistrados para as amostras S24, S31, S36. Pode-se considerar que esses isolados, secretam diferentes enzimas em algum momento do seu período de crescimento, conforme podemos perceber pelo método utilizado.

Na Figura 21, observa-se a contribuição de cada isolado na degradação dos diferentes substratos utilizados. Interessante observar que o isolado S24 comparando com S25 identificado como gênero *Rhizopus*, teve o mesmo comportamento na degradação do

substrato de proteinase e amilase. Por outro lado, os isolados S36 e S31 identificados como *Phoma* sp., formaram maiores halo de degradação para amilase, seguido dos gêneros *Fusarium* sp. O isolado S31 *Phoma* sp. foi o único dos representantes que mostrou atividade para a enzima lacase.

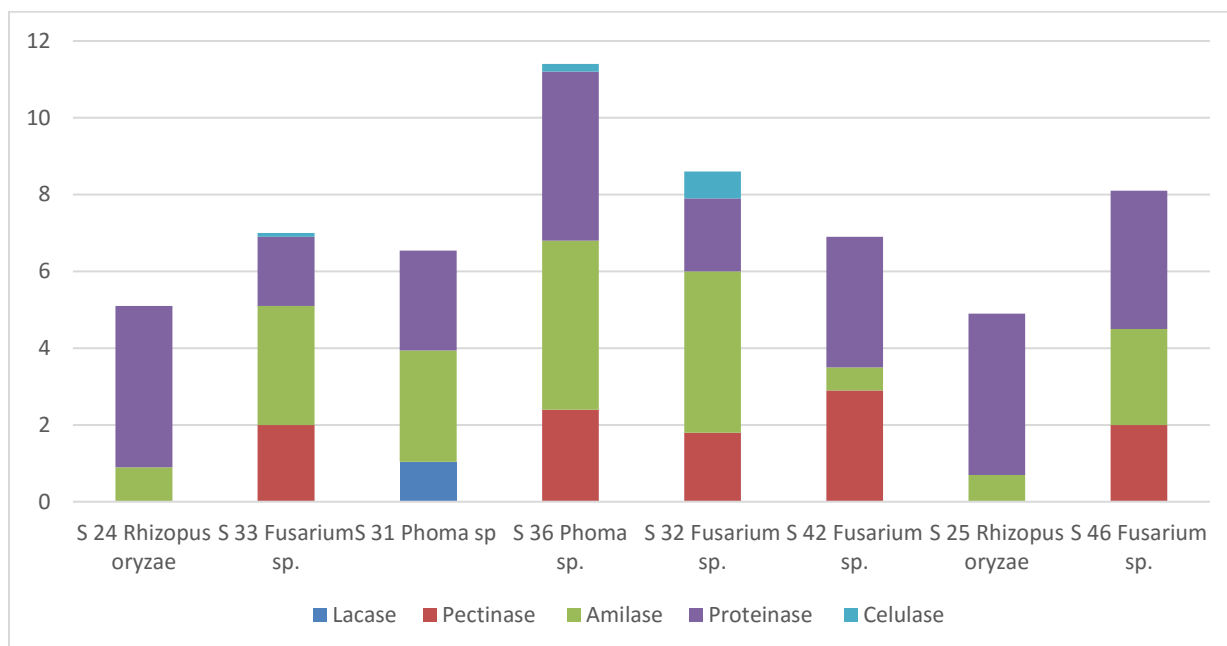
Para Palheta (2011), amilases são enzimas comumente encontradas na natureza que hidrolisam, progressivamente as moléculas de amido a unidades de glicose. Cuzzi (2011), realizou estudos com fungos endofíticos e evidenciou halos de degradação para *Fusarium* sp e *Fusarium oxysporum* na produção de amilase e para proteases, utilizando da mesma forma fragmentos de colônias. No entanto, neste trabalho os halos de degradação registrados são maiores que o índice, encontrados por este mesmo autor. Cuzzi (2011), destacou ainda, que existem poucos trabalhos sobre os estudos enzimáticos envolvendo exoenzimas produzidas por espécies do gênero *Fusarium* sp. mostrando, desta forma, que espécies deste gênero possuem potencial na produção enzimática, necessitando de mais estudos neste sentido.

**Tabela 14.** Atividade enzimática semi qualitativa dos isolados frente aos diferentes substratos enzimáticos

Isolados	Índice enzimático das amostras (cm)				
	Lacase	Pectinase	Amilase	Proteinase	Celulase
S 24 <i>Rhizopus oryzae</i>	0	0	0,9	4,2	0
S 33 <i>Fusarium</i> sp.	0	2	3,1	1,8	0,1
S 31 <i>Phoma</i> sp	1,04	0	2,9	2,6	0
S 36 <i>Proma</i> sp.	0	2,4	4,4	4,4	0,2
S 32 <i>Fusarium</i> sp.	0	1,8	4,2	1,9	0,7
S 42 <i>Fusarium</i> sp.	0	2,9	0,6	3,4	0
S 25 <i>Rhizopus oryzae</i>	0	0	0,7	4,2	0
S 46 <i>Fusarium</i> sp.	0	2	2,5	3,6	0

Cuzzi (2011) salientou que a habilidade de um fungo em produzir enzimas varia entre espécies, como também entre isolados de uma mesma espécie. Pode-se observar pelos dados da tabela 14, que esse fato acontece, pois, a variação dos halos de degradação são bastante evidentes como nos testes para lacase em que apenas um representante mostrou índice enzimático. Para pectinase a espécie *R. oryzae* e o isolado S31 *Phoma* sp.

não apresentaram halo de degradação, repetindo essa variação nos testes para amilase e celulase. Essa variação pode estar relacionada a fatores fisiológicos específicos de cada espécie ou isolado. No entanto, não é muito bem percebida para os testes com proteinase, onde há uma certa uniformidade na produção de enzimas em todas as espécies ou isolados (Tabela 14 e Figura 24).



**Figura 24.** Representação gráfica dos fungos filamentosos na secreção de enzimas de interesse comercial

Foi realizada a análise de componentes principais com dados da Tabela 14, a mesma caracteriza-se por ser do tipo amostras x variáveis quantitativas (enzima).

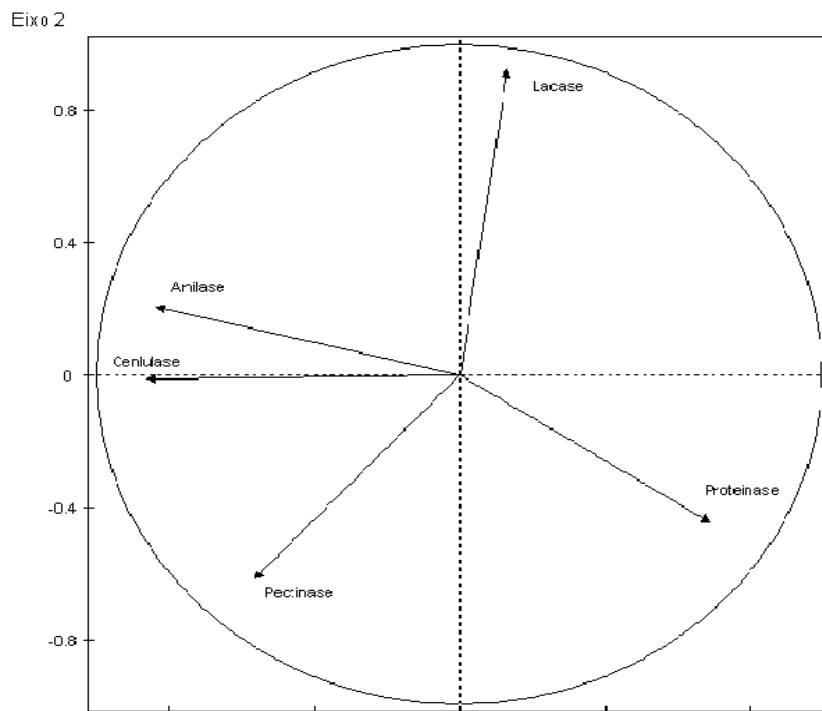
Observaram-se oito amostras (S24, S25, S33, S31, S46, S42, S32, 36) e o índice enzimático das amostras: lacase, pectinase, amilase, proteinase e celulase.

O objetivo desta análise foi comparar um conjunto de amostras de fungos filamentosos, das quais são conhecidos os valores de conjunto de caracteres quantitativos (enzimas).

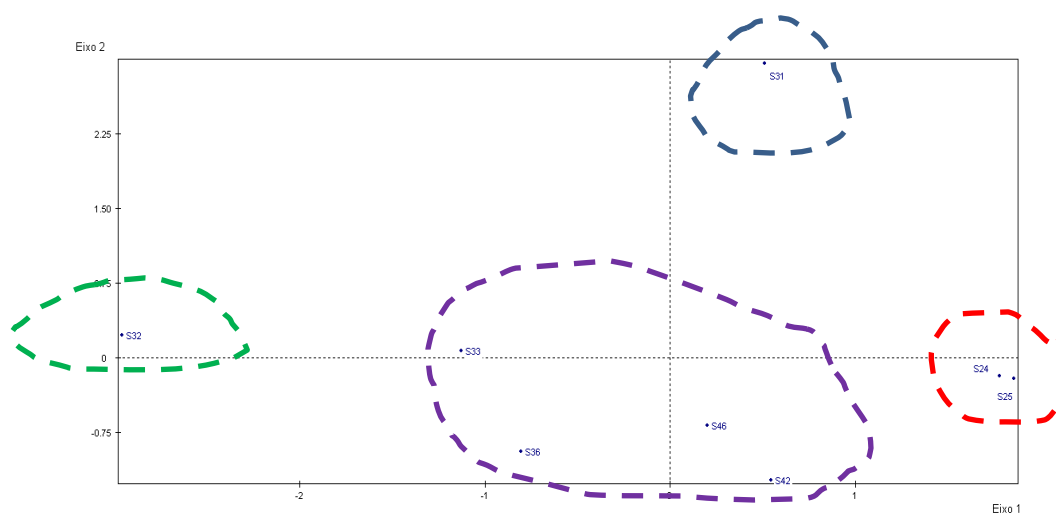
O primeiro plano fatorial absorve 74,05% da inércia total. O primeiro eixo absorve 44,72% e 29,34% o segundo eixo fatorial.

Na Figura 25 das variáveis, apresenta correlação positiva entre amilase e celulase com eixo I. A proteinase apresentou correlação positiva com o eixo I. A lacase apresentou correlação positiva com eixo II e pectinase apresentou correlação negativa com eixo II.

Percebe-se correlação positiva  $r = 0,60$  entre amilase x celulase na 1ª coordenada, correlação negativa entre pectinase e lacase  $r = -0,47$ , e entre amilase e proteína  $r = -0,43$  e entre proteína e celulase  $r = -0,49$ .



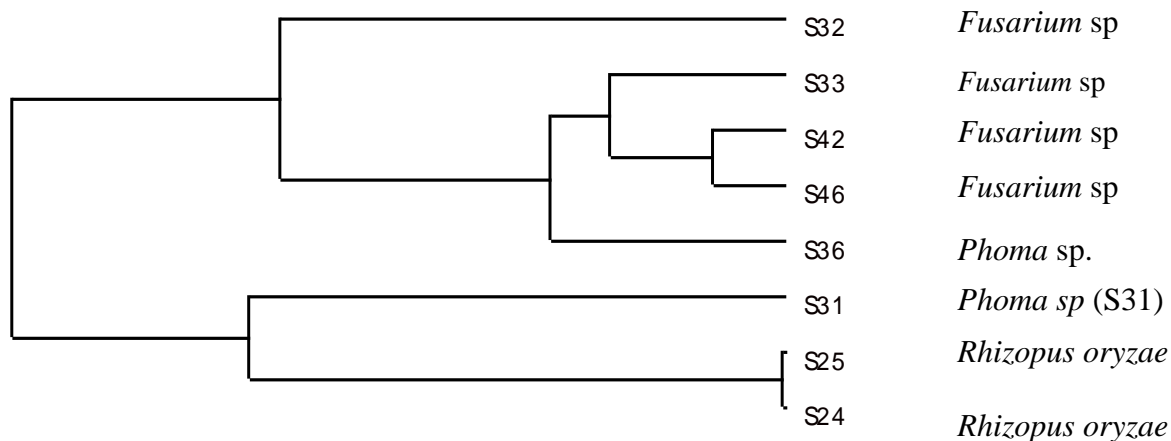
**Figura 25.** Representação das variáveis nos componentes 1 e 2 da ACP.



**Figura 26.** Figura mostrando a proximidade entre os indivíduos.

A proximidade entre dois pontos-indivíduos significa semelhança entre os indivíduos em função dos fatores combinados pelas variáveis (Figura 26).

Classificação hierárquica direta



**Figura 27.** Representação dos indivíduos (amostras de fungos) no dendrograma.

A análise multidimensional ACP permite analisar conjuntamente variáveis contínuas, por outro lado, é importante pois permite-nos levantar hipóteses sobre a similaridade dos indivíduos por meio da produção de substâncias entre eles (Figura 27).

Na Figura 28, percebe-se o aspecto da formação dos halos de degradação de substratos testado, observar a formação de halo de lacase pelo isolado S31 *Phoma* sp., indicando correlação que esta enzima possui na degradação de hidrocarbonetos.



**Figura 28.** Aspecto dos halos de degradação das amostras frente a diferentes substratos: evidencia-se a ação da lacase, celulase, pectinase.



## 7. CONCLUSÃO

Os micro-organismos (fungos e bactérias) selecionados, mostraram-se promissores quanto à biodegradação do petróleo e a produção de biossurfactantes ou bioemulsificantes.

Novos estudos relacionados à produção enzimática por fungos e bactérias, envolvidas no processo de biodegradação do petróleo e seus derivados, precisam ser realizados com o intuito de identificar e testar sua ação biodegradadora e a enzima específica.

O fungo *Phoma* identificado nesta pesquisa mostrou possuir ação na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo por meio do teste utilizando indofenol, além de apresentar ação emulsificante do diesel em 52 % e redução da tensão superficial da água de 71,23 mN/m para 51,03 mN/m e produzir enzimas do tipo lacase, amilase e proteinase.

O fungo do gênero *Phoma* sp. precisa ser estudado em outros meios de crescimento alternativos de baixo custo, com o intuito de melhorar a produção de biossurfactantes e bioemulsificantes, assim como a identificação e caracterização dos mesmos, para futuras aplicações comerciais.

Nos testes qualitativos para verificar a produção de diferentes enzimas comerciais, os fungos filamentos utilizados na presente pesquisa, mostraram possuir potencial na produção de diferentes enzimas, indicando com isso uma oportunidade de aprofundar os estudos em relação a esse tema.

O extrato aquoso do fungo *Phoma* não mostrou toxicidade frente ao teste com *Artemia salina*.

A bactéria *Microbacterium* sp. selecionada produziu 3,0 g/L de biossurfactante e as frações testadas promoveram a redução de tensão superficial abaixo de 40 mN/m e emulsificação do diesel em 1,7 cm de altura.

As análises realizadas por meio de HPLC/MS, Infravermelho e RMN revelaram que provavelmente este composto produzido é um composto do tipo ácido graxo de cadeia longa, provavelmente não iônico.

A bactéria *Microbacterium* sp. selecionada nesta pesquisa necessita de estudos mais detalhados do biossurfactantes produzido quanto a composição química, com intuito de elucidar sua estrutura, assim como promover o seu crescimento em diferentes fontes de carbono de baixo custo, combinado com a avaliação de diferentes pHs e temperaturas com o intuito de melhorar a produção de biossurfactantes.

O extrato aquoso e liofilizado da bactéria, não apresentaram citotoxicidade frente as diferentes doses testadas, indicando com isso segurança na utilização desse composto.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, H. L.; HAMED, M. M.; LOTFABAD, T. B.; ZAHIRI, H. S.; SHARAFI, H. MASOOMI, F.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; ORTIZ, A.; AMANLOU, M.; NOGHABI, K. A. Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Iran, 113, 2, 211–219, 2013.

AGÊNCIA INTERNACIONAL DE ENERGIA – IAE, 2003. Disponível em: <[http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/atlas/pdf/07-Petroleo\(2\).pdf](http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/atlas/pdf/07-Petroleo(2).pdf)>, acesso em: 15 de mai. 2014.

ALMEIDA, D. G.; SILVA, M. G. C.; SOUZA, F. S.; SILVA, D. D. L.; MACIEL, C. C. S.; TAKAKI, G. M. C.; GUSMÃO, N. B. Produção de celulase, polifenoloxidase e tanase por fungos filamentosos. In: **Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão – JEPEX, IX, 2012**, Recife. Disponível em: <[http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/lista\\_area\\_02.htm](http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/lista_area_02.htm)>. Acesso em: 15 de Nov, 2015.

ANTUNES, A. A.; ARAÚJO, H. W. C.; SILVA, C. A.; ALBUQUERQUE, C. D.; TAKAKI, G. M. Produção de biossurfactante por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 utilizando milhocina e óleo de milho pós-fritura como nutrientes. **Agroecology/Scientific article**, São Paulo, 80, 3, 334-341, 2013.

ARAÚJO, W. L.; LACAVA, P. T.; MARCON, J.; LIMA, A. O. S.; SOBRAL, J. K.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. **Guia Prático: Isolamento e caracterização de Micro-organismos Endofíticos. Departamento de Genética**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo, 167 p. 2010.

ARAÚJO, S. P. **Produção de inóculo microbiano, obtido de macrófitas aquáticas na amazônia, com potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo**. Tese de Doutorado (Biotecnologia) Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

ATLAS, R. M. Microbial hydrocarbons degradation-bioremediation of soils spills. **Journal Chemical Technology and Biotechnology**, 52, 149-156, 1995.

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L., Santos, A. A. BIOESTAT - Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Bio-Médicas. Mamirauá. Belém, PA. p. 364, 2007.

AZEVEDO J. L.; MACCHERONI JR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAUJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, 3, 40-60, 2000.

AZEVEDO, J. L. **Genética de micro-organismos**. 2º ed. Goiânia: Editora UFG, Goiânia 2008.

BANAT, I.; MAKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, 53, 495-508, 1995.

- BATISTA, I. H. **Biorremediação de ambientes aquáticos contaminados por resíduos de petróleo**: um estudo com bactérias isoladas de *Eichornia crassipes* na Amazônia. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.
- BENTO, M. F., CAMARGO, F. A., GAYLARDE, C. C.). Biossurfactantes. In Melo, I. S., Azevedo, J. L. (Org.) **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 152-184. 2008.
- BEZERRA, M. S, HOLANDA, V. C. D; AMORIM, J. A; MACEDO, G. R; SANTOS, E. S. Produção de biotensoativo utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (p.a.) e resíduo agroindustrial (manipueira) como substrato. **Holos**, 28, 14-27, 2012
- BHARDWAJ, G.; CAMEOTRA, S. S.; CHOPRA, H. K. Isolation and purification of a new enamide biosurfactant from *Fusarium proliferatum* using rice-bran. **RSC Adv**, 5, 54783–54792. 2015
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces**, 152, 41-52, 1999.
- BOECHAT, S. C. O gênero *Ichnanthus* (Poaceae – Panicoideae – Paniceae) no Brasil. **Iheringia**, Sér. Bot., Porto Alegre, 60, 2, p. 189-248, 2005
- CAMACHO-CHAB, J. C.; GUÉZENNEC, J.; CHAN-BACAB, M. J.; RÍOS-LEAL, E.; SINQUIN, C.; MUÑIZ-SALAZAR, R.; SUSANA, C.; ROSA-GARCÍA D.; REYES-ESTEBANEZ, M.; ORTEGA-MORALES, B. O. Emulsifying Activity and Stability of a Non-Toxic Bioemulsifier Synthesized by *Microbacterium* sp. MC3B-10. **Int. J. Mol. Sci.**, 14, 18959-18972, 2013
- CANHOS, V. P.; UMINO, C. Y.; MANFIO, G. P. Coleções de micro-organismos: coleções de culturas de micro-organismos. 82-101. 2006. Disponível em: <<http://www.biota.org.br/pdf/v72cap03.pdf>> Acesso em: 11 de dezembro de 2012.
- CARNEIRO, D. A.; LUCAS, P. G. A. biorremediação como ferramenta para a descontaminação de ambientes terrestres e aquáticos. **Revista tecer**. Belo Horizonte, 3, 4, 2010.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 24, 270-276, 1939.
- CIAPINA, E. M. P. **Produção de Biossurfactante por *Rhodococcus erythropolis* em Biorreator de Bancada e Avaliação do seu Efeito na Biodegradação de Borra Oleosa da Indústria do Petróleo**. Tese (Doutorado em Química) - Rio de Janeiro, 2008.
- COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, Rio Grande, 13, 85-103, 2003.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 2, 224-229, 1987. In: COUTO, S.R., SANROMÁN, M.A (org.). **Application on solids tate fermentation to food industry**. A review *Journal of Food Engineering*. 2006.
- CUZZI, C. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *baccharis dracunculifolia* d.c. (asteraeceae). **Gl. Sci. Technol**, 04, 02, 47 – 57, 2011.

DE JESUS, T. B.; SOUZA, S. S.; SANTOS, L. T. S. O.; DE AGUIAR, W. M. Avaliação da Potencialidade de Utilização de Espécies de Macrófitas como Acumuladoras de Metais Pesados. **Rev. Virtual Quim**, 7, 4, 1102-1118. 2015.

DECESARO, A.; RIGON, M. R.; THOMÉ, A.; COLLA, L. M. Produção de biossurfactantes por micr-organismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. **Química Nova**, 36, 7, 947-954, 2013.

DHARA, P.; SACHDEV, S.; CAMEOTRA, S. Appl Microbiol Biotechnol. **Published online**, 97, 3, 1005–1016, 2013.

DINIZ, C. R.; BEATRIZ, S. O.; JOSÉ, E. L.; ANNEMARIE, K. Uso de macrófitas aquáticas como solução ecológica para melhoria da qualidade de água. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** (Suplemento), 2005.

DITTMER, J. C.; LESTER, R. L. A simple, specific spray for the detection of phospholipid on thin-layer chromatograms. **Journal of Lipid Research**, 5, 126-127, 1964.

DUNN I. S.; BLATTNER, F. R. Charons 36 to 40: Multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. **Nucleic Acids Res**, 15, 2677-2698, 1987.

FAHEINA-JUNIOR, G.; BRAGA, R.; LOPES, V. R.; MARTINS, C. Atividade Xilanolítica em Cepas de *Fusarium*. **Simpósio Nacional de Bioprocessos**. Natal-RN. Agosto de 2009.

FARIA, A. F. **Biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* em glicerina residual**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Ciências do Alimento, Universidade Federal de Campinas, Campinas, 2010.

FIETCHTER, A. Biosurfactants: moving industrial application. Institute for biotechnology. **Ekevler Science PuM**, 10, 208-217, 1992.

FINNEY, D. J. Probit analysis: A statistical treatment of the sigmoid response curve. Oxford: England, p. 256, 1947.

GASTAL, Jr.; L.; IRGANG, B. Levantamento de macrófitas aquáticas do Vale do Rio Pardo, Rio Grande do Sul, **Brasil. Iheringia, série Botânica**, 49, 3-9, 1997.

HAASANSHAHIAN, M., GITI, E., SIMONE, C. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. **Marine Pollution Bulletin**, 2012.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. G. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycology**, 67, 597-607, 1975.

HANSON, K. G.; DESAI, D. J.; ANJANA, D. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology techniques**, 7, 10, 745-748, 1993.

HARMS, H.; SCHLOSSER, D. WICK, L. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. **Nature Reviews, microbiology**, 9, 177-192, 2011.

HERATH, K.; HARRIS, G., JAYASURIYA, H.; ZINK, D.; SMITH, S.; VICENTE, F. Isolation, structure and biological activity of phomafungin, a cyclic lipodepsipeptide from a Widespread Tropical *Phoma* sp. **Bioorg Med Chem**,17, 1361–1369, 2009.

HOLM, L.; YEO, R. The biology control and utilization of aquatic weeds. **Weeds Today**, 7-13, 1980.

HOROWITZ, S.; GILBERT, J. N.; GRIFFIN, M. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. **Journal of Industrial Microbiology**, 6, 243-248, 1990.

ISOLA, J., DE VRIES, S., CHU, L. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. **Journal Pathology**, 145, 6, 1301-1308, 1994.

JACKISCH-MATSUURA, A. B. J. **Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação**. Tese (Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

JACKISCH-MATSUURA, A. B; SANTOS, L. S; EBERLIN, M. N; FARIA, A. F, GROSSMAN, M. J., DURRANT, L. R. Production and characterization of surface-active compounds from *Gordonia amicalis*. **Brazilian Archive Biology Technology**, 57, 138-144, 2014.

JACQUES, R. J. S; BENTO, F. M. ANTONIOLLI, Z. I; OLIVEIRA, F. A. C. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, 37, 4, 2007.

JAIN, D. K., COLLINS-THOMPSON, D. L., LEE, H.; TREVORS J. T. A drop-collapsing test for screening surfactante producing microorganisms. Department of Environmental Biology, *University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada*~ **Journal of Microbiological Methods**, 13, 271 – 279, 1991.

JARA, M., ROSILEIDE, F. S., CAMPOS-TAKAKIC, G. M. Physicochemical characterization of tensio-active produced by *Geobacillus stearothermophilus* isolated from petroleum-contaminated soil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 101, 315-318, 2013.

JIA, Y.; SHI-ZHONG, Y.; BO-ZHONG, M. Structural characterization of lipopeptides from *Enterobacter* sp. strain N18 reveals production of surfactin homologues. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.** 117, 890-898, 2015.

JUNIOR, N. L; GERN, R. M.; FURLAN, S. A; SCHLOSSERET, D. Laccase production by the aquatic ascomycete *Phoma* sp. UHH 5-1-03 and the white rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 during submerged cultivation on banana peels and enzyme applicability for the removal of endocrine-disrupting chemicals. **Appl Biochem Biotechnol**, 167, 1144–1156, 2012.

KINGSTON, P. F. Long-term Environment Impact of Oil Spills. **Science & Technology Bulletin**, 7, 53-61, 2002.

KITAMOTO, D.; IKEGAMI T.; SUZUKI G. T.; SASAKI A. TAKEYAMA, Y.; IDEMOTO, Y.; KOURA, N.; YANAGISHITA H. Microbial conversion of n-alkanes into

glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma (Candida antarctica)*. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Central 5, Higashi 1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8565, Japan. **Biotechnology Letters**, 23, 1709–1714, 2001.

KREPSKY N.; DA SILVA F. S.; FONTANA, L. F., CRAPEZ, M. A. Alternative methodology for isolation of biosurfactant-producing bacteria. **Braz. J. Biol.**, 67, 1, 117-124, 2007.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCAU, E. M.; MELO, N. T. Tratado de micologia médica. 9.ed. São Paulo, **Sarvier**, 1104, 2002.

LIU, H; WANG, H; CHEN, X.; LIU, N.; BAO, S. Biosurfactant-producing strains in enhancing solubilization and biodegradation of petroleum hydrocarbons in ground water. **Environmental Monit Assess**, 186, 7, 4581-9, 2014.

LOPES, A.; PIEDADE, M. T. F.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. Efeito da dosagem do petróleo de Urucu (Coari-AM) sobre a sobrevivência de *Echinochloa polystachya* (Projeto Piloto). Anais do I Congresso Internacional do PIATAM. Universidade Federal do Amazonas / Centro de Pesquisas da Petrobrás, Manaus, Amazonas, 113-113, 2005.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**. 4 ed, Nova Odessa, SP, Ed. Instituto Plantarum, 2008.

LUNA, J. M; SARUBBO, L.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. A New Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP1002: Characteristics of Stability and Application in Oil Recovery. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 52, 4, 785-793, 2006.

LUZ, C.; SANTOS, E.; SANTOS, S.; MUSSY, M.; YAMASHITA, M.; BASTOS, W.; BRUCHA, G.; MARLON M.; MARIZA, G. Estudos de biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano coletado em Porto Velho-RO, Amazônia. **Química Nova**, 34, 5, 775-779, 2011.

MACIEL, C.; SOUZA, C., SILVA, P.; SOUSA, M.; QUEIROZ, F.; GUSMÃO, N. Cinética de degradação de querosene de aviação por *Penicillium* sp. através da bioestimulação. **R. bras. Bioci.**, Porto Alegre, 11, 1, 39-42, 2013.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, 24, 1, 87-93, 2001

MARIANO, A. P. ANGELIS, D. F; PIRÔLLO, M. P.; CONTIERO, J.; BONOTTO, M. D. Investigation about the Efficiency of the Bioaugmentation Technique when Applied to Diesel Oil Contaminated Soils. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Rio Claro, 52, 5, 1297-1312, 2009.

MEYER, B. N. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, 45, p. 35-34, 1982.

MILLIOLI, V. S. **Avaliação da potencialidade da utilização de surfactantes na biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo**. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

MISHAGI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, 80, 808-811, 1990.

MOLDES, A. B.; PARADELO, R.; VECINO, X.; CRUZ, J. M., Gudiña E, RODRIGUES L, Barral MT. Partial characterization of biosurfactant from *Lactobacillus pentosus* and comparison with sodium dodecyl sulphate for the bioremediation of hydrocarbon contaminated soil. **BioMed Research International**, 2013, 1-6, 2013.

MOLLEA, C.; BOSCO, F.; RUGGERI, R. Fungal biodegradation of naphthalene: microorganisms studies. **Chemosphere**, 60, 636-643, 2005.

MUSSATO, S.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. Enzima – Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, São Paulo, 41, 242, 28-33, 2007.

NAKAYAMA, G.; CATON, M., NOVA, M.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the alamar blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of Immunology Methods**, 204, 205-208, 1997.

NEERATI, R.; YANAMALA, V. Identification and Characterization of Lipids by TLC in Parotoid Gland Secretion and Its Extract of *Bufo melanostictus* (Schneider). **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, India, 2, 20, 117-121, 2013.

NEIVA, J. **Conheça o petróleo**. Rio de Janeiro, 6<sup>a</sup> ed. Expressão e Cultura, 1993.

NETTO, A. D.; JOSINO, C. M.; ANA ELISA X.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L. F.; OLIVEIRA, A. S. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HAPs) e seus derivados nitrados (NHPAS): uma revisão metodológica. **Química nova**, São Paulo, 23, 6, 765-773, 2000.

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

OLIVEIRA, J. G. **Utilização de melão, maniveira e soro de queijo como substratos para produção de biossurfactante por *Bacillus pumilus* e sua aplicação em biorremediação de solo**. Tese (Doutorado em Ciências Exatas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2014.

OLIVEIRA, M. V.; SILVA, S.; COSTA, T. M.; LIMA, A. S. Biodegradação de BTx utilizando micro-organismo selecionados de Solos efluentes industriais. **Cadernos de Graduação - Ciências Exatas e Tecnológicas**. Sergipe, 1, 15, p. 35-44, 2012.

OLIVEIRA, S. D.; LEMOS, J.; BARROS, C.; LEITE, S. Emprego de fungos filamentosos na biorremediação de solos contaminados por petróleo: Estado da Arte. Série **Tecnologia Ambiental**, 45. CETEM/MCT. Rio de Janeiro, 67, 2008.

PACHECO, G. J. **Produção de biossurfactantes por *Rhodococcus erythropolis* e sua aplicação na remoção de óleo de sedimentos arenosos**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

PALHETA, A. Enzimas e aplicações biotecnológica. In: TEIXEIRA, M. F. (org.). **Fungos da Amazônia uma riqueza inexplorada (Aplicações biotecnológicas)** Manaus: Edua, 2011.



PARASZKIEWICZ, K. KANWAL, A. DŁUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. **Journal Biotechnology**, 92, 287–294, 2001.

PARVIZ, D.; AYATOLLAHIA, S.; MOWLAA, D. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPPI-2. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 84, 2, 292-300, 2015.

PEDRALLI, G. **Macrófitas aquáticas como bioindicadoras da qualidade da água: alternativas para usos múltiplos de reservatórios**. Ecologia e Manejo de Macrófitas Aquáticas. Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2003.

PEDROTI, G. I. **Ensaio de biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do petróleo em solos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2007.

PENG, F.; WANG, Y.; SUN, F.; LIU, Z.; LAI, Q; SHAO, Z. A novel lipopeptide produced by a Pacific Ocean deep-sea bacterium, *Rhodococcus* sp. TW53. **Journal of Applied Microbiology**. 105, 698-705, 2008.

PEREIRA, D. S. Potencial das Actinobactérias na biodegradação de hidrocarbonetos. **Revista Eletrônica TECCEN**, Vassouras, 5, 2, 71-96, 2012.

PEREIRA, J. O.; SOUZA, A. Q. L.; HANADA, R. E. Diversidade de Micro-organismos Endofíticos de Plantas da Amazônia Brasileira. In: COATA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A. M. (org.). **Micologia: avanços no conhecimento**. Sociedade Brasileira de Micologia, 01, 141-148, 2007.

PEREIRA, W. V. **Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PINTO, M. H. **Produção de biossurfactantes bacteriano e fúngico por fermentação em estado sólido e submersa utilizando resíduos agroindustriais**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Rio Grande-RS, 2008.

PINTO, M.; MARTINS, R.; COSTA, J. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Química Nova**, 328, 2104-2108, 2009.

PIRÔLLO, M. S. **Estudo da produção de Biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. Dissertação (Mestrado em Biociências) Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2006.

RAPP, P.; BACKHAUS, S. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeast, and bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, 14, 938-943, 1992.

RISER-ROBERTS, E. **Bioremediation of petroleum contaminated sites**. Boca Ratón, FL. CRC Press: 1992.

ROELANTS, S. L.; DE MAESENEIRE, S. L.; CIESIELSKA, K.; VAN, B. In, Soetaert W. Biosurfactant gene clusters in eukaryotes: regulation and biotechnological potential. **Appl Microbial Biotechnol**, 98,8, 3449-61, 2014

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Environmental biotechnology**, 13, 249–252, 2002.

SANTOS, E.S. **Micro-organismos promissores para degradação de compostos fenólicos presentes em bagaço de cana de açúcar, lodo e águas residuais de agroindústrias sulcroatólicas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Macéio, 2007.

SILVA, E. J.; ROCHA, E.; SILVA, N.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SILVA, R. O.; SARUBBO, L. A. Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Pernambuco, 117, 36-41, 2014.

SILVA, M.; ESPÓSITO, E. O papel dos fungos na recuperação ambiental. In: Espósito, E.; Azevedo, J. L. **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul, EDUCS, 2004.

SKALADANY, G. J.; METTING, F. B. Jr. Bioremediation of contaminated soil. In: METTING, F. B. Jr. (Ed.) **Soil microbial ecology**. New York: Marcel Dekker, Cap. 17, p. 483-513, 1993.

SOARES, D. W. **Produção e caracterização de biossurfactantes obtidos por linhagens de Bacillus sp. Isoladas de estação de tratamento de águas residuais e de solo de Manguezais (Ceará-Brasil)**. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará. Ceará, 2014.

SOBRAL, J. K. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta**. Tese (Doutorado em Microbiologia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 2003.

SOURAV, D., SUSANTA, M., GHOSH, A., SAHA, R., SAHA, B. A. A review on natural surfactants. **Royal Society of Chemistry**, 5, 65757–65767, 2015.

SOUSA, M., DANTAS, I. T., FELIX, A. K. N., SANT'ANA, H. B., MELO, V. M. M., GONÇALVES, L. R. B. Crude glycerol from biodiesel industry as substrate for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 57, 295-301, 2014.

SPINDOLA, L. A. **Macrófitas aquáticas em duas lagoas marginais do Rio Taquari, Coxim, MS**. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2007.

SURYANTI, V.; MARLIYANA, S. D.; HANDAYANI, D. S.; RATNANINGRUM, D. Production and characterization of biosurfactant by *pseudomonas fluorescens* using *Cassava flour* waste water as media. **Indonesia Journal Chemistry**, Indonesia, 13, 3, 229 - 235, 2013.

TONINI, R.; REZENDE, C. E.; GRAVITOU, A.D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, 14, 4, 1027-1035, 2010.

VIANA, S. M. **Riqueza e distribuição de macrófitas aquáticas no Rio Mojilinho e tributários (São Carlos-SP)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2005

## ANEXOS

### 1. ARTIGO PUBLICADO NO AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY

# Potential biosurfactant producing endophytic and epiphytic fungi, isolated from macrophytes on the Negro river in Manaus, Amazonas

João Marcelo Silva Lima<sup>1</sup>, José Odair Pereira<sup>1,2</sup>, Ieda Hortêncio Batista<sup>3</sup>, Pedro de Queiroz Costa Neto<sup>2</sup>, Jucileuza Conceição dos Santos<sup>1</sup>, Solange Pires de Araújo<sup>4</sup>, Mozanil Correia Pantoja<sup>2</sup>, João Lúcio de Azevedo<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Rede Bionorte de Biodiversidade e Biotecnologia/Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus – AM – Brasil. <sup>2</sup>Faculdade de Ciências Agrárias/UFAM, Manaus – AM – Brasil. <sup>3</sup>Universidade do Estado do Amazonas, Manaus – AM – Brasil. <sup>4</sup>Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia/UFAM, Manaus – AM – Brasil. <sup>5</sup>Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP – Brasil

## ABSTRACT

*Endophytic and epiphytic fungi isolated from Eichhornia crassipes (Mart.) Solms and Cyperus ligularis L., macrophytes collected in oil-contaminated waters, were investigated so as to assess their potential for producing biosurfactants ; the most promising ones were identified by means of the rDNA region sequencing. In the selection as to hydrocarbonate biodegradation activity, the 2,6-dichlorophenol (DCPIP) in oil-added Bushnell-Haas (BH) medium was the indicator utilized . The following tests were performed to ascertain the biosurfactant activity: Emulsification measurement, drop collapse, surface tension and production slope. Of the twenty isolates, twelve grew in oil-added BH medium; eight of which promoted DCPIP discoloration. Isolate S31 presented emulsion of the diesel (1.5 cm or 52%) with reduction of the water surface tension in 51.03 mN/m, and was identified as **Phoma** sp. The other identified fungi were: **Rhizopus oryzae**, **Gibberella moniliformis**, **Fusarium oxysporum**, **F. proliferatum**, **F. fujikuroi** and **Penicillium citreonigrum**, presenting potential for the biodegradation of hydrocarbonates, as well. New studies with **Phoma** sp. such as, on its cultivation in different carbon sources will be necessary, for improving the production of secondary compounds involved in surface tension emulsification and reduction*

Keywords: Bioremediation, bioemulsifiers, *Eichhornia*, *Cyperus*, Oil, diesel

## INTRODUCTION

Biosurfactants may be of microbial origin and show potential for commercial applications in several fields. These products show to be efficient in processes of microbial enhanced oil recovery and bioremediation on hydrocarbon-contaminated environments. They also possess potential applications in agriculture, raw materials for cosmetics, pharmaceutical products, detergents, personal hygiene products and food processing, among others (Cola e Costa 2003; De et al. 2015). They are more advantageous than the synthetic-derived ones when one considers their biodegradability and low toxicity.

Biosurfactants are biologically produced from various substrates, such as waste from tropical agronomic cultures, food processing industries, fruit processing industries, petroleum processing, and coffee processing industries (Bento et al. 2008; De et al. 2015).

Given that biosurfactants are produced by bacteria, yeasts and filamentous fungi, they may be produced by endophytic and epiphytic fungi as well. Endophytic microorganisms, according to Azevedo (2008), are those that, at least for one period of their life cycle, inhabit inside a plant, as opposed to the epiphytic ones that live on its surface.

*Curvularia clavata*, *Fusarium proliferatum* and *Phoma* sp. isolated from different hydrocarbonate-contaminated environments, are the major species of the genera cited as biosurfactants producers. As to the biodegradation of hydrocarbonates, genera *Cladophialophora* and *Exophiala* assimilate toluene; *Aspergillus* sp. and *Penicillium* spp. degrade aliphatic hydrocarbonates, aliphatic hydrocarbonates, chlorophenols, polycyclic aromatic hydrocarbonates (PAHs), pesticides, synthetic dyes and 2,4,6- trinitrotoluene ( TNT) (Azevedo 2008; Oliveira et al 2008; Harms et al 2011; Bhardwaj et al 2015; Neoh et al . 2015).

Fungi are able to grow under environmental stress conditions: low pH, poor in nutrients and with low water availability media favor their growth (Mollea et al. 2005). They may still, though more rarely, produce biosurfactants (Luz 2011; Jaquiche-Matsuura et al. 2014).

The purpose of this work is to assess the potential held by endophytic and epiphytic fungi, as to the biodegradation of hydrocarbons and production of biosurfactants.

## MATERIAL AND METHODS

### Samples and Biological Material

The isolates utilized make part of the Collection of Cultures of the Biodegradation Laboratory of the Agronomic Sciences College of the Federal University of (UFAM). The microorganisms were isolated from the macrophytes *Cyperus ligularis* L. and *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms collected close to the effluents output from the Petrobras/Manaus-AM (REMAN) refinery, and stored according to Castellani (1939). Plant species were identified at the herbarium of the National Research Institute of Amazonia – INPA.

Fungi were grown on Petri dishes containing potato dextrose Agar (PDA) medium (Himedia) at 28 °C for nine days and transferred to Bushnell-Haas (BH) Broth (Sigma-Aldrich) medium added with 2 mL of oil. Following the mycelial growth in BH for nine days, 5 mm-diameter disks were utilized as pre-inoculation in the subsequent tests in 250 mL Erlenmeyer flasks with 100 mL of liquid BH medium added with 5 mL of oil, the pH was adjusted to 5 and they were incubated for 14 days at 30 °C.

### Filamentous Fungi Molecular Identification

It was performed only on samples that presented a positive result in the indicator test with redox 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP) containing oil and on those with a result above 1 cm for emulsification index. For the extraction of the DNA, we utilized the Plant/Fungi DNA isolation kit (Norgen Biotek Corp) according to the manufacturer's instructions.

Primers ITS1 (5' – TCC GTA GGT GAA CCT GCG G – 3') and ITS4 (5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3') were utilized for the amplification of the region kept in specific positions of the 18S and 28S of the rDNA gene. We purified the amplicons with polyethylene glycol 8000 and sequenced them in genetic ABI 3500xL (Applied Biosystems®). Sequences were aligned and edited in MEGA program with grouping by Neighbor - Joining method and, employed for identifying isolates by comparing themselves with the type sequences based on the results found in BLASTn.

### Oil

Crude oil originated from the Urucu Oil Base, Amazonas, Brazil and the diesel acquired at a BR gas station, and previously filtered. Oil and diesel doses were utilized according to Jaquiche-Matsuura et al. (2014).

### **Biodegradability test using the redox 2,6-dichlorophenol Indophenol indicator (DCPIP) indicator**

The biodegradability test was performed through the DCPIP technique (Hanson et al. 1997). The experiment was carried out on a 96-well polystyrene plate, DCPIP concentration adjusted to 0.010 g/mL. Two-hundred (200)  $\mu\text{L}$  of the DCPIP solution, 10  $\mu\text{L}$  of oil from Urucu, and fungus inoculation corresponding to  $2\pm 3$  mm of the diameter, were added to each well. The plates were kept at room temperature ( $27\pm 2$  °C). Medium discoloring-time measurements were taken following 24 and 48-hours. DCPIP with oil and, just indophenol, were used as positive and negative control, respectively.

### **Specific Medium for Biosurfactants Production**

Biosurfactant production was undertaken in 50 mL of culture medium constituted by  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/L,  $\text{NaNO}_3$  3 g/L, yeast 1 g/L and peptone 0.3 g/L extract, with pH adjusted at 5 for filamentous fungi, modified by Rapp and Backhaus (1992). Diesel oil or oil at 1.0 % v/v was employed as carbon source.

Microbial culture was carried out in 125 mL Erlenmeyer flasks at 30 °C in orbital incubator (New Brunswick Scientific) with 150 rpm steady stirring for 20 days. Erlenmeyer flasks with 50 mL of culture medium and 1 % of diesel oil (v/v), with no inoculation, which was used as control. Every microorganism was cultured in triplicate. Following the incubation period, the culture media were filtered in filtering membrane (TPP, Europe/Switzerland) with 0.45 mm porosity coupled to the 20 mL sterilized syringe.

### **Oil Drop Collapse Qualitative Test**

The test was conducted in (60 x 12 mm) Petri dishes containing 3.5 mL of filtered cell-free extract. For carrying out the test, an oil drop was added to the cell-free extract in triplicate and observed for 0, 1, 5, 30 min, 1 and 72 hours. The result was regarded positive when there was dispersion of the oil drop. Three-point-five (3.5) mL fungus-free extract; and 3.5 mL 1 M Dodecyl Sulfate Sodium (DSS) surfactant solution were used as negative and positive control, respectively.

### **Emulsification Activity Assessment**

The specific medium for the production of biosurfactants was filtered and assessed as to the water in oil (W/O) type, emulsification. The test was performed in triplicate. Three (3) mL of the cell-free cultures extracts and 2 mL of diesel were added in test tubes. These were stirred for two minutes in vortex at 70 rpm and kept at rest for 24 h. Following this period, the emulsified oil height (cm) was compared to the total one (Cooper and Goldenberg 1987). The emulsification index was measured according to the conventions adopted by Paraszkiwicz et al. (2001), and calculated according to equation (1):

Equation (1):

$$E_{24} = \frac{H_e}{H_t} \times 100$$

With:  $E_{24}$  = Emulsification index following 24 h (%)

$E_{\text{emulsion}}$  = Emulsion height

$H_t$  = Total height

### **Diesel Emulsion Production Slope**

For production slope, we utilized the specific medium for the production of biosurfactants and diesel at 10 % (v/v) as carbon source, by maintaining the pH 5. Into each 50 mL Erlenmeyer flask we added, as inoculation, five, 5 mm disks of the fungus culture through 150 rpm steady stirring in orbital incubator (New Brunswick Scientific) at 30 °C. The emulsification index was measured by utilizing equation (1) every 48 h for a total of 14 triplicate measures. The statistical analysis was performed through standard deviation means calculated with the *software* BioEstat 5.3 (Ayres et al. 2007).

### **Surface Tension Assessment**

Surface tension measure is a common tool and an indirect method for monitoring the production of biosurfactants. As the microorganism grows, it synthesizes the biosurfactant and this metabolite is excreted to the metabolic broth, reducing the surface tension. The surface tension was measured in the Kruss model tensiometer (K-6, Germany), by the ring method (Du Noüy). The analyses were performed with the supernatant obtained after the raw sample centrifugation at 25 °C.

Every time the analyses were begun, the ring was sterilized by gas burner and calibrated by checking the distilled water surface tension whose value is about 72.8 mN / m . Three measures of surface tension were performed, being considered the arithmetic mean of the results ( Paraszkiwicz et al 2001 ; . Jaquiche - Matsuura et al 2014)

### **Toxicity Test using *Artemia salina***

We performed the toxicity assay with *A. salina* according to Meyer et al. (1982) by preparing a solution with sea-salt in the concentration of 30 g.L<sup>-1</sup>. The pH was adjusted to eight with NaOH 0.1 mol/L<sup>-1</sup> solution. We utilized this solution in the preparation of the remaining dilutions. The eggs were put to hatch in a saline solution for 48 h, with steady aeration at 25 °C.

The test was conducted in multi-welled plates, by utilizing the cell-free extract concentrations: 100, 50, 25, 13, 7 and 3 µL; ten *A. salina* larvae, with 2000 µL being the final value.

Following 24 hrs., mortality was determined with the aid of a stereoscopic binocular microscope (Leica El 224). The LC50 was calculated according to Finney ( 1947)..

## RESULTS

### Isolates Molecular Identification

Eight fungi selected by growth in oil-added BH medium were identified through sequencing part of the rDNA gene. Its fragments containing ITS1-5,8S-ITS2 region presented from 531 to 562 bp. Epiphytic fungi S31 and S36 isolated from *C. ligularis* were identified as *Phoma* sp.; S24 *Rhizopus oryzae*; S32 *F. oxysporum*; S33 *Gibberella moniliformis*; and S42 *F. proliferatum*. Among endophytic fungi, S42 was identified as *F. fujikuroi* and S51 *Penicillium citreonigrum*, both originating from *E. crassipes*. Results from sequences most related to those in *National Center for Biotechnology Information* are in Table 1.

Table 1. Molecular identification of endophytic and epiphytic fungi isolated from macrophytes in the Negro river-Amazonas/Brasil, utilizing NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) data as reference.

Iso*	Micro-organisms	NCBI Sequences	Hosts	Endo.*	Epi.*	Id.*(%)
S24	<i>Rhizopus oryzae</i>	<a href="#">KJ460029.1</a>	<i>Cyperus ligularis</i>		X	99
S31	<i>Phoma</i> sp.	<a href="#">KM979945.1</a>	<i>C. ligularis</i>		X	100
S32	<i>Fusarium oxysporum</i>	JX406507.1	<i>Eichhornia crassipes</i>		X	99
S33	<i>Gibberella moniliformis</i>	EU151472.1	<i>C. ligularis</i>		X	98
S36	<i>Phoma</i> sp.	<a href="#">KM246267.1</a>	<i>C. ligularis</i>		X	100
S42	<i>F. proliferatum</i>	<a href="#">KJ020897.1</a>	<i>C. ligularis</i>		X	99
S46	<i>F. fujikuroi</i>	KM369868.1	<i>C. ligularis</i>	X		99
S51	<i>Penicillium citreonigrum</i>	<a href="#">KF031329.1</a>	<i>E. crassipes</i>	X		97

\*Iso = Isolate; Endo = Endophytic; Epi = Epiphytic; Id = Identity

Among the eight analyzed fungi only *Phoma* sp. (S31), showed to be efficient in the tests undertaken to select biosurfactant producers. Though they had dispersed an oil drop at different times, the remaining isolates formed no emulsion above 1 cm, according to the adopted method (Table 2).



Table 2. Selection of endophytic and epiphytic fungi isolated from macrophytes in the Negro river– Amazonas/Brazil for the production of biosurfactants

Isolates	Oil drop collapse						Emulsification Index	Surface Tension
	0	1 min	5 min	30 min	1h	72h	H <sub>u</sub> /E <sub>24</sub>	
<i>Phoma</i> sp. (S31)	+	+	+	+	+	+	1.5 cm/52 %	51.03 mN/m
<i>Penicillium citreonigrum</i>	-	-	-	+	+	+	0.7 cm/38 %	-
<i>Phoma</i> sp.	-	-	±	±	±	±	0	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	-	-	±	±	±	±	0	-
<i>Fusarium fujikuroi</i>	-	-	-	-	-	-	0	-
<i>F. proliferatum</i>	-	+	+	+	+	+	0	-
<i>F. oxysporum</i>	-	-	±	±	±	±	0	-
<i>Gibberella moniliformis</i>	-	±	±	±	±	±	0	-
Control								
DSS	+	+	+	+	+	+	100 %	
BH+FFO	-	-	-	-	-	-	0	53,03 mN/m
Water								71,26 mN/m

\*DSS = Dodecyl Sodium Sulfate was used as positive control and BH+FFO= Fundus Free Oil medium, was used as negative control. H<sub>u</sub> = emulsified height, E<sub>24</sub> = emulsification index in 24 h.

Only *Phoma* sp. (S31) was selected for surface tension test, since it showed to be positive in the oil drop collapse test sooner and its emulsification reached above 1 cm. The difference between fungus extract and control surface tensions showed to be 2 mN/m, yet when it came to water it was 18.23 mN/m indicating to be able to break surface tension. For ascertaining the fungus extract-promoted diesel emulsification, a production slope, takingk emulsified height-fungus growth relativeness into account, was performed (Fig. 1).

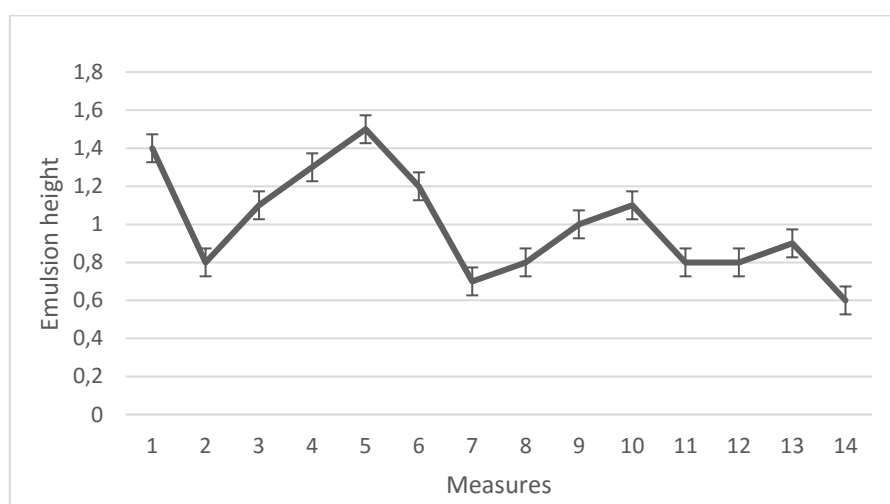


Figure 29 – Biosurfactant production slope of the endophytic fungus *Phoma* sp. (S31) isolated from *Cyperus ligularis* L. occurring in an oil-contaminated area on the Negro river – Amazonas/Brazil.

The slope shows bioemulsifier production to occur up to the 14<sup>th</sup> measure, yet its peak took place at the fifth, or ten days following its growth, forming 1.5 cm high emulsion. This variation kept on going to the very end of the experiment.

The cell-free aqueous extract from *Phoma* sp. (S31), showed no toxicity when it came to *A. salina* in the utilized concentrations (Fig. 2).

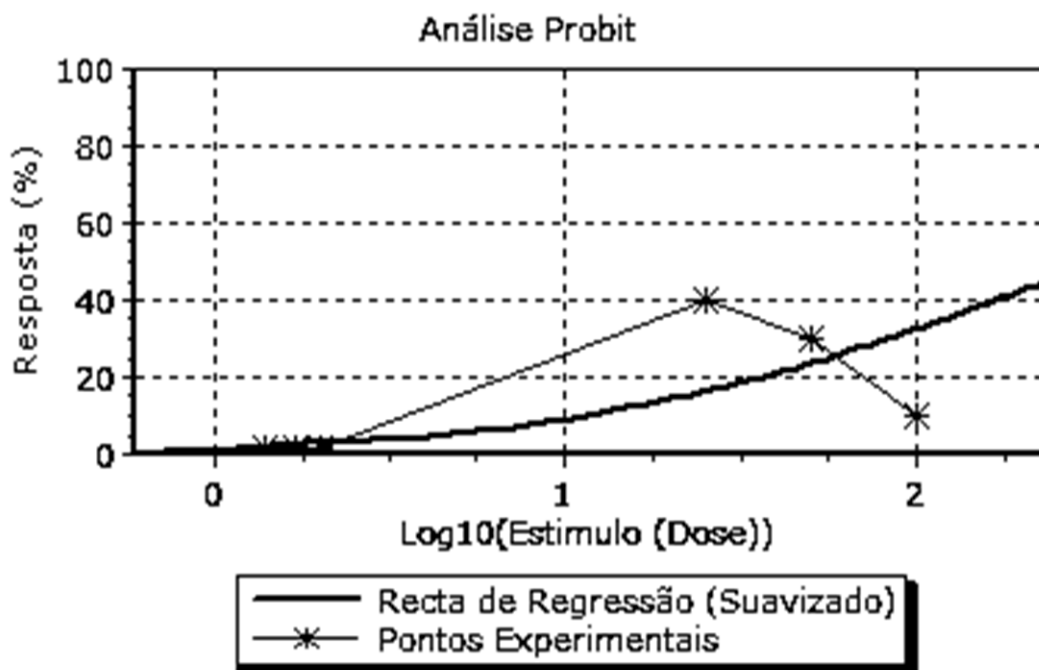


Figure 2 - Probit analysis of the six utilized cell-free *Phoma* sp. (S31) fungal extract concentrations 100, 50, 25, 13, 7 and 3  $\mu$ L

## DISCUSSION

Oil added BH medium-grown isolates behavior may be analyzed according to Jaques (2007); Maciel et al. (2013) and Cruz et al. (2014) where, both fungi and bacteria may be hydrocarbon biodecomposers. Microorganisms showing to be successful on these compounds degradation process should produce enzymes able to utilize complex oil molecules in their metabolic pathways intermediate products. In this case fungi would have non- and ligneous metabolic pathways; just as *Cunninghamella elegans*, *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus fumigatus* and *C. Lunata* fungi, which have already been studied as oil and its derivatives decomposers (Paraszkievicz, et al. 2001; Jaques et al. 2007; Bhatt et al. 2012).

Junior et al. (2012) point *Phoma* genus fungi out to be good producers of laccase, a phenol group enzyme able to biodegrade phenolic compounds and hydrocarbons; Carneiro (2010) corroborates this view in an important work on bioremediation, using microorganisms in the metabolization of several compounds, including oil.

Harms (2011) reported *Rhizopus* genus cultures to be potential HPAs decomposers, this, in a certain way, may account for this genus species presence in the selecting tests using oil-added BH medium (Table 1). Balaji et al. (2015), in a work carried out in India cited nine genera fungi such as: *Aspergillus*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Lasioidiplodia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, and *Trichoderma*, isolated from oil-contaminated soil. One notes most cited genera, to also be found in the present work (Table 1), thereby indicating their potential for producing enzymes, which can cope with oil and its derivatives hydrocarbons degradation.

The filamentous fungus *C. clavata* was cited by Neoh et al. (2014) and Neoh et al. (2015) to bio remediate palm industry effluents, produce ligneous enzymes, in addition to dramatically reduce polyphenolic compounds. Detoxification of effluent indicates *C. clavata* suitability in the bioremediation of organic effluents, this fact is important, since it can direct future works utilizing fungi, identified in the present research on similar processes.

As to DCPIP oxidation time, the Identified Amazonian fungi corroborate Maciel et al. (2013), who found it to take from 14 to 25 h for these fungi to promote indophenol discoloration. Isolates from macrophytes promoted it within 24 hrs. In the work by Luz et al. (2011), it took 96 h.

Maciel et al. (2013) pointed out the isolates responsible for degradation to be identified as: *P. aurantiogriseum*, *P. corylophilum* and *P. griseofulvum*. Other species from this genus were identified amongst the isolates from macrophytes, as well (Table 2).

To Silva and Esposito (2004) the degradation of pollutants the degradation of pollutants is performed by the intracellular enzyme cytochrome P450 monooxygenase system, which makes water soluble products less toxic and leads to detoxification process. These enzymes are likely involved in this process. Those Authors reported genera *Trichoderma* and *Fusarium* in oil-contaminated soils; *F. fujikuroi* and *F. oxysporum* were isolated from macrophytes in an oil-contaminated environment.

Regarding biosurfactants production, though filamentous fungi had grown in oil-added BH medium, as their sole carbon source, most were unable to produce it through selective tests such as drop collapse, emulsification index and surface tension.

*Phoma* sp. (S31) was the only one able to produce oil drop collapse in less than 1 min, show 1.5 cm or 52 % emulsification index, compared to oil and diesel, this index is regarded to be moderate, according to Jaquiche-Matssura et al. (2014); and, in addition to it, produce 51.03 mN/m surface tension.

This fungus bears emulsifying property, yet little ability to reduce surface tension relative to control (53.03 mN/m) and more ability for reducing surface tension in relation to water (72.01 mN/m) (Table 3). The low superficial tension might be due to the difficulty of using the hydrocarbonate present in diesel oil for the synthesis of biosurfactants (Decesaro et al. 2013). On the other hand, it is likely that, through the performed tests, the biosurfactant present in the fungus substrate be of high molecular weight, which would indeed account for the diesel oil's low surface tension and stabilizing property (Bento et al. 2008).

The formed emulsion was of the A/O type, suggesting organic compounds present in this emulsifier, to possess hydrophilic characteristics due to emulsion formation always taking place between water and diesel oil or oil. This characteristic is paramount in pollutants bioremediation, since it can aid on the bio stimulation or bio augmentation process, facilitating other microorganisms physiological growth in the oil hydro carbonates-contaminated medium (Nitschke e Pastore, 2002; Deon et al. 2012; Jackisch-Matsuura et al. 2014).

Jackisch-Matsuura et al. (2014) cited the difficulty for finding filamentous fungi as good producers of biosurfactants and holding the ability to reduce surface tension, a fact observed in this study. On the other hand, bio emulsifier production by fungi and bacteria should be thoroughly studied, since they may be utilized in several applications, such as: food processing and paint manufacturing industries, among others (Bezerra et al. 2012).

The best bioemulsifier production activity by *Phoma* sp. (S31) occurred at the tenth day. The emulsification index observed in the slope, ranged from 0.6 to 1.5 cm. Such emulsification measures are comparable to those presented by extracts from *Lactobacillus pentosus* utilized in the bio emulsification of kerosene, gasoline and octane (Moldes 2013) and *F. proliferatum* for n-dodecane compounds (Bhardwaj et al. 2015).

From tropical *Phoma* sp., Herath et al. (2009) identified a cyclic-structured lipopeptide compound, classified as *Phomafungy*, which showed to be efficient as an antifungal in several performed tests. Apart from the work by Herath et al. (2009), it was not possible to cite any other citations of genus *Phoma* sp. as biosurfactant or bio emulsifier producer. This opens an opportunity for carrying out new studies on the now identifies *Phoma* sp. (S31) isolate.

Through the toxicity test, the aqueous extract from bio emulsifier producing species, showed no toxicity on the different utilized concentrations. Such finding was also observed by Decesaro et al. (2013), who found no toxic activity for bio emulsifiers from fungi and bacteria tested in their work.

Further studies involving *Phoma* genus species addressing biosurfactant production mainly on what pertains to cultivation in different carbon sources are needed, so that one may express the production of the involved secondary compounds, both on emulsification and reduction of surface tension. The sequence of studies involving *Phoma* sp. (S31) might lend promising results in different fields of the food, pharmacological and oil industries.

The selection of filamentous fungi keeps on being a great challenge due to their low biosurfactant yield

## CONCLUSION

Every identified fungus showed to be promising in oil and diesel degradation. Thus, a deeper study pertaining to these fungi enzyme yield, is necessary, so as to prospect for enzymes of commercial interest, which would be related to oil and its derivatives biodegradation, as well as a deepening in the studies on production of biosurfactants by the selected *Phoma* sp.

Microorganisms originating from environments of areas with a history of oil and its derivatives contamination, possess physiological mechanisms that actually assist them on capturing hydrocarbonates used as a carbon source as was found in the test carried out in the present study performed tests.

## ACKNOWLEDGMENTS

The Authors thank CAPES for the help it provided to the undertaking of this project.

## REFERÊNCIAS

- Azevedo JL. Genética de microrganismos. 2. ed. Goiânia: UFG, 2008; 490p.
- Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL, Santos AA. BIOESTAT - Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Bio-Médicas. Mamirauá. Belém, PA. 2007; 364p.
- Bhardwaj G, Cameotra SS, Chopra HK. Isolation and purification of a new enamide biosurfactant from *Fusarium proliferatum* using rice-bran. *RSC Adv.* 2015; 5: 54783–54792.
- Balaji V, Arulazhagan P, Ebenezer P. Enzymatic bioremediation of polyaromatic hydrocarbons by fungal consortia enriched from petroleum contaminated soil and oil seeds. *J Environ Biol.* 2014; 35: 3-9.
- Bezerra MS, Holanda VCD, Amorim JA, Macedo GR, Santos ES. Produção de biotensioativo utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (p.a.) e resíduo agroindustrial (manipueira) como substrato. *Holos.* 2012; 28: 14-27.
- Bhatt R, Patel K, Trivedi U. Purification and properties of extracellular poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase produced by *Aspergillus fumigatus*. *J Polym Environ.* 2010; 18: 141-147.
- Bento MF, Camargo FA, Gaylarde CC. Biossurfactantes. In: Melo IS, Azevedo JL. (Ed.) *Microbiologia Ambiental.* 2. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2008; 647p.
- Cruz JM. Biodegradation and phytotoxicity of biodiesel, diesel, and petroleum in soil. *Water Air Soil Pollut.* 2014; 1: 225-1962.
- Carneiro DA, Lucas PG. A biorremediação como ferramenta para a descontaminação de ambientes terrestres e aquáticos. *Tecer.* 2010; 3: 82-95.
- Colla LM, Costa JV. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. *Vetor,* Rio Grande. 2003; 13: 85-103.
- Cooper DG, Goldenberg BG. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol.* 1987; 53: 224-229.
- Castellani A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J Trop Med Hyg.* 1939; 24: 270-276.
- De S, Susanta M, Ghosh A, Saha R, Saha B. A review on natural surfactants. *RSC Adv.* 2015; 5: 65757–65767.
- Decesaro A, Rigon MR, Thomé A, Colla LM. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. *Quim. Nova.* 2013; 36: 947-954.
- Deon MC, Rossi A, De Magro CD, Reinehr CO, Colla LM. Bioremediation of contaminated soil with oils residuals through bioaugmentation and natural attenuation. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas.* 2012; 33: 73-82.
- Finney DJ. Probit analysis: A statistical treatment of the sigmoid response curve. Oxford: England, 1947; 256p.
- Harms H, Schlosser DW. Untapped potential: Exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9: 177-192.
- Herath K, Harris G, Jayasuriya H, Zink D, Smith S, Vicente F. *et al.* Isolation, structure and biological activity of phomafungin, a cyclic lipodepsipeptide from a Widespread Tropical *Phoma* sp. *Bioorg Med Chem.* 2009; 17: 1361–1369.

- Hanson KG, Desai DJ, Desai AJA. Rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology Techniques*. 1993; 10: 745-748.
- Jackisch-Matsuura AB, Santos LS, Eberlin MN, Faria AF, Grossman MJ, Durrant LR. *et al.* Production and characterization of surface-active compounds from *Gordonia amicalis*. *Braz Arch Biol Technol*. 2014; 57: 138-144.
- Junior NL, Gern RMM, Furlan SA, Schlosser D. Laccase production by the aquatic ascomycete *Phoma* sp. UHH 5-1-03 and the white rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 during submerged cultivation on banana peels and enzyme applicability for the removal of endocrine-disrupting chemicals. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012; 167: 1144–1156.
- Jacques RJS, Bento FM, Antonioli ZI, Camargo FO. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*. 2007; 37: 1192-1201.
- Luz CC, Santos EA, Santos MOS, Mussu MY, Yamashita M, Bastos WR. *et al.* Estudos de biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano coletado em Porto Velho – RO, Amazônia. *Quim Nova*. 2011; 34: 775-779.
- Maciel CCS, Souza CS, Silva PA, Sousa MFVQ, Gusmão NB. Cinética de degradação de querosene de aviação por *Penicillium* sp. através da bioestimulação. *R bras Bioci*. 2013; 11: 39-42.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnan JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Aughlin J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med*. 1982; 5: 31-34.
- Moldes AB, Paradelo R, Vecino X, Cruz JM, Gudiña E, Rodrigues L, Barral MT. Partial characterization of biosurfactant from *Lactobacillus pentosus* and comparison with sodium dodecyl sulphate for the bioremediation of hydrocarbon contaminated soil. *BioMed Research International*. 2013; 2013: 1-6.
- Mollea C, Bosco F, Ruggeri B. Fungal biodegradation of naphthalene: Microcosms studies. *Chemosphere*. 2005; 60: 636-643.
- Neoh CH, Lam CY, Lim CK, Yahya A, Ibrahim Z. Utilization of agro-industrial residues from palm oil industry for production of lignocellulolytic enzymes by *Curvularia clavata*. *Waste Biomass Valor*. 2015; 6: 385–390.
- Neoh CH, Lam CY, Ware AYI, Ibrahim Z. Decolorization of palm oil mill effluent using growing cultures of *Curvularia clavata*. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2014; 21: 4397–4408.
- Nitschke M, Pastore GM. Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. *Quim Nova*. 2002; 25: 772-776.
- Oliveira SD, Lemos JLS, Barros CA, Leite SGF. Emprego de fungos filamentosos na biorremediação de solos contaminados por petróleo: Estado da Arte. Série Tecnologia Ambiental, 45. CETEM/MCT. Rio de Janeiro. 2008; 67p.
- Paraszkiewicz K, Kanwal A, Długon'ski J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *J Biotechnol*. 2002; 92: 287–294.
- Silva M, Espósito E. O papel dos fungos na recuperação ambiental. In: Espósito E, Azevedo JL. (Ed.) Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2. ed. Caxias do Sul: EDUCS; 2004; 337-375.

## 2. ARTIGO ACEITO NA REVISTA WATER, AIR, OIL POLLUTION

### Biosurfactants produced by *Microbacterium* sp., isolated from aquatic Macrophytes in Hydrocarbons-contaminated area on the Negro river/Manaus, Amazonas.

João Marcelo Silva Lima<sup>1</sup>, José Odair Pereira<sup>2</sup>, Ieda Hortêncio Batista<sup>3</sup>, Pedro de Queiroz Costa Neto<sup>2</sup>, Raimundo Carlos Pereira Junior<sup>3</sup>, Ani Beatriz Jackisch-Matsuura<sup>4</sup>, Hileia dos Santos Barroso<sup>3</sup>, Cecília Verônica Nunez<sup>3</sup>, João Lúcio Azevedo<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Rede de Biodiversidade e Biotecnologia/Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus – AM – Brasil. [Jlima873@gmail.com](mailto:Jlima873@gmail.com). 55 92 3237-4672. Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6200, Coroado I CEP: 69077-000

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências Agrárias/UFAM, Manaus – AM – Brasil. Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6200, Coroado I CEP: 69077-000

<sup>3</sup>Universidade do Estado do Amazonas, Manaus – AM – Brasil. Av. Djalma Batista, 2470, Chapada CEP 69050-010

<sup>4</sup>Centro de Pesquisas Leônidas e Maria Deane/Fiocruz Amazônia, Manaus – AM – Brasil. Rua Terezina, 476, Adrianópolis CEP 69057-070

<sup>5</sup>Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP – Brasil. Av. Pádua Dias, 11 CEP 13418-900

**Abstract** Endophytic bacteria isolated from *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms., collected in oil waste-contaminated waters in an effluent of a refinery of Petrobras/Manaus were investigated to evaluate their potential biosurfactants yield. The selected bacterium was identified through the sequencing of the rDNA region. To select better microorganisms regarding the characterization of biosurfactants, the following tests were performed: degrading activity of hydrocarbons through the discoloration of the indicator 2,6 indophenol (DCPIP), emulsifying diesel, drop collapse technique, surface tension and biosurfactant production analysis. The chemical characterization was performed using the FT-IR, UFLC/MS e RMN<sup>1</sup>H techniques. Using diesel fuel as carbon font, the bacterium selected in this study produced 3g/L of biosurfactant, and was effective in degrading petroleum by using indophenol test (DCPIP). The fractions obtained using chromatographic column were useful in the reduction of water surface tension by 40 mN/m, especially fraction 1, which reduced it to 34.17 mN/m. According to the analysis through different chemical identification techniques, it can be inferred that this is probably a long - chain fatty acid lipid type, which can be used in the future both as biosurfactant in decontamination processes of areas affected by hydrocarbons and as bioemulsifier in countless processes, since it presented no toxicity as determined by Alamar blue method.

**KeyWords:** Bioremediation; *Eichhornia*; Diesel

### 1 INTRODUCTION

Biosurfactants may have microbial origin and present potential commercial applications in many sectors. These products are effective in the enhanced oil recovery and bioremediation of hydrocarbons-contaminated environments. They also have potential application in agriculture, as input in cosmetics, pharmaceutical, personal hygiene and food processing products, among others (Colla, Costa 2003; Sourav et al. 2015). They have advantages over synthetic surfactants, considering their biodegradability and low toxicity.

Biosurfactants are biologically produced from various substrates, such as waste from tropical agronomic crops, fruit processing industries, oil processing and coffee processing industries, and others (Bento, Camargo and Gaylarde 2008; Sourav et al. 2015).

Bacteria are the main microorganisms that produce biosurfactants, among them the varieties of the genera *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp. are the most representative (Bezerra et al. 2012; Decesaro et al. 2013).

Bacteria of the genus *Microbacterium* have resistance property and absorb heavy metals like Zn (II) and Cd (II), in addition, they can grow in lubricating oil, which indicates them to be able to degrade hydrocarbons (Supaphol et al. 2013; Kim et al. 2013), because of this characteristic, they probably produce biosurfactants as a way of preliminary assimilation of these compounds (Bento, Camargo and Gaylarde 2008). Hassanshahian, Giti and Simone (2011); Kumar et al. (2012) and Wongwongsee et al. (2005) reported emulsifiers formation for this genus, however without precising the amount and type produced Camacho-Chab et al. (2013) have isolated the genus *Microbacterium* from marine environments and identified a compound recorded as microbatan. In Amazon freshwater environments, which are affected by hydrocarbons, no studies were found on the production of biosurfactants with bacteria of this kind, thus opening an opportunity to identify new species that produce biosurfactants or emulsifiers in these environments.

This study is an important contribution to identifying strains of bacteria collected from similar environments in the Amazon region. These strains can further be exploited commercially, both in the production of new bioemulsifiers or biosurfactants, as well as biodegradation of contaminated oil environments, and open a range of new possibilities for research with these microorganisms, notably with regard to their physiology in producing amphiphilic compounds.

The present study aims to evaluate the production of biosurfactants by *Micobacterium* sp. M87 isolates *Eichhornia crassipes* (Marts.) and perform chemical characterization of its molecules.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Microorganisms

We used M87 isolates, isolates from *E. crassipes* collected in the close vicinity of the exit of the effluent from a refinery of Petrobrás/ Manaus (REMAN).

#### 2.1.1 Molecular Taxonomy based in 16S rRNA gene sequence

The bacterium was identified by Isola et al. [12] methodology. The DNA responsible for the synthesis of the ribosomal 16S region was amplified using primers 530F (5' - TGA CTG ACT GAG TGC CAG CMG CCG CGG - 3') and 1492R (5' - TGA CTG ACT GAG AGC TCT ACC TTG TTA CGM YTT - 3') (Invitrogen - USA).

The amplicons were purified with two enzymes: exonuclease (EXO) and shrimp alkaline phosphatase (SAP). The sequencing reaction or PCR was carried out with thermocirculator My Genie96 Thermal Block. The sequences were aligned and edited with MEGA6 software Tamura et al. 2013 and grouped by Neighbor-Joining method, and used to identify the isolates by comparing them with the patterns based on the results found in BLASTn.

#### 2.2 Biodegradability test using redox 2,6-dichlorofenol indophenol (DCPIP).

Biodegradability test was performed using an adaptation of redox 2,6-dichlorofenol indophenol (DCPIP) indicator (Hanson et al. 1997). The bacterium was assessed in test tubes with 2 mL of indophenol at 0.010 mg/L diluted in Bushnell Hass (BH) (Himedia) and 10 µL of crude oil. Two bacterial loops were used as inoculum for each of three replications. The evaluations were made after 24 and 48 hours to detect biodegrading activity.

### 2.3 Drop collapse qualitative test

The test was conducted in duplicates, in Petri dish containing 3.5 mL of growing bacteria dye and one oil drop. It has gone through the following time gaps: 0, 1, 5, 30 minutes and 72 hours. The result was considered positive when dispersion and drop collapse happened. As negative control it was added 3.5 mL from BH extract + oil, and the same volume of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) at 1 M was used as positive control.

### 2.4 Particular environment to produce biosurfactants

The production of biosurfactants was undertaken in 50 mL of growth medium consisting of MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, NaNO<sub>3</sub> 3 g/L, 1 g/L of yeast extract and 0.3 g/L of peptone with pH in 6.8, modified RPP and Backhaus [20]. As carbon font, it was used diesel oil at 1.0% (v/v). And 20 µL of bacterial suspension, corresponding optical density OD 600 nm, was added.

The microbial culture was made in 125 mL Erlenmeyer flask at 30 °C in orbital incubator (New Brunswick Scientific) with constant 150 rpm stirring for 96h. Erlenmeyer flasks with 50 mL of growth medium and 1% of diesel oil (v/v), without inoculum were used as scientific control. The test was conducted in triplicate. After the incubation period, the growth medium was filtered through a 0.22 µm porosity membrane coupled to the 20 mL sterile syringe (TPP, Europe/Switzerland), as used by Jackiche-Matsuura et al. (2014), with modifications.

## **2.5 Diesel emulsion production analysis**

To find out the best time for production of the biosurfactant a study was conducted through the production curve.

A specific medium and diesel at 1.0% (v / v) as carbon source and pH 6.8, were used to produce biosurfactants. Twenty (20) uL of the bacterial suspension with an optical density OD of 600 nm were added to each 50 ml Erlenmeyer flask with constant 150 rpm stirring in an orbital incubator (New Brunswick Scientific) at 30 ° C in triplicate. The production of the emulsion was calculated in centimeters for 24 hours during six days, Cooper, Goldenberg (1987). Statistical analysis was performed using arithmetic mean and standard deviation calculated on the BioEstat 5.3 software Ayres et al. (2007).

## **2.6 Extraction and purification of produced biosurfactants**

The biosurfactants extraction was conducted by using liquid-liquid method. Chloroform and methanol solvents in 2:1 ratio, were used. The organic phase was separated in Erlenmeyer flask and the solvent was evaporated from 50 °C to 75 °C in rotary evaporator. The obtained sample was frozen and lyophilized with Jackisch-Matsuura et al. (2014) modifications.

## **2.7 Preliminary identification of biosurfactant**

Two point five (2.5) mg of the crude extract were dissolved in 100 uL of methanol. Ten (10) µL of the solution on silica gel plate Merck 60 were added. The plate was eluted for 30 minutes with chloroform: methanol (1:1). Iodine vapors were utilized as developers to detect the presence of lipids (Neerati; Yanamala 2013) Ne and Rhodamine spray 6G (0.005%) visualized under UV lamp (Horowitz, Gilbert and Griffin 1990), sulfuric acid 6N with heating at 100 ° C to verify the presence of amino acids and other organic compounds Dittmer and Lester (1964).

## **2.8 Isolation of biosurfactants using chromatographic column**

The substances in the lyophilized extract were purified using a 20 cm high and 2.7 cm diameter chromatographic column. Fifty-four (54) g of silica gel 60 Merck and then, 25 g of lyophilized extract were added. Chloroform methanol was used in different ratios (2:1, 1:1, 1:2 v/v) to elute the column Reis et al. (2015). The fractions were grouped by similarity after the application of the developer and visualization with UV lamps.

## **2.9 Surface tension evaluation**

The analysis was performed with the main chromatographic column-obtained fractions: 205, 358, 916, 135, and 144 mg. All fractions were diluted in 20 ml distilled water. The surface tension of the different fractions was measured by the Kruss Tensiometer Model (K-6, Germany) by the ring (method Du Nouy) at 25 °C.

## **2.10 Biosurfactant structural identification**

### **2.10.1 Infrared spectroscopy (IR)**

The analysis of the characteristic functional groups of surfactants was performed by spectroscopy in the infrared Fourier transformed spectroscopy (FT-IR). The FT-IR spectra were obtained using FTLA 2000-104 spectrophotometer ABB Bomem, the observed spectral range was 4000 to 400 cm<sup>-1</sup> using KBr pellets.



## 2.10.2 Mass spectrometry (HPLC/MS)

Analyses were performed using a system of Ultra-Fast Liquid Chromatography (UFLC) (Shimadzu) coupled with a tandem mass spectrometer (Bruker micrOTOF QII), equipped with a standard ESI source. The capillary voltage and ion collision energy showed to be 4500 V and 650 Vpp, respectively.

## 2.10.3 Nuclear magnetic resonance (NMR)

Samples were analyzed by nuclear magnetic resonance spectroscopy of hydrogen ( $^1\text{H-NMR}$ ), they were solubilized in deuterated methanol. Spectra were obtained with a Varian Inova 500 equipment, operating at a frequency of 500 MHz.

## 2.11 Cytotoxicity test

### 2.11.1 Cell Culture

MRC-5 cells (human fibroblasts) were obtained from the cell bank of Rio de Janeiro, Brazil and kept in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), which was supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 U/ml). The cells were incubated at 37 ° C in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$ .

### 2.11.2 Cell viability assay:

Cytotoxicity was determined by Alamar blue method as described by Nakayama et al. (1997). Briefly, adherent cells ( $5 \times 10^3$  cells / plates) were seeded in 96 tissue culture plates and exposed to lyophilized and crude extracts (1.42 to 100  $\mu\text{g/mL}$ ) for 72 h. After incubation, the solution of Alamar Blue (10  $\mu\text{L}$  of 0.4% of Alamar Blue, suspended in water) was added and the cells were incubated for 3 h at 37 ° C. The fluorescence was measured (excitation at 545 nm and emission at 595 nm). Assays were performed in triplicate. Doxorubicin (5 $\mu\text{g/ml}$ ) was used as a cell death positive control. Results were calculated by the control cells absorbance difference.

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Microorganisms utilized for the production of biosurfactants

The bacteria M87, isolated from *E. crassipes*, was morphologically identified as gram-positive cocci. Its DNA was extracted and its sequence was compared in the Blast analysis, with 99% of identity and query cover of 100% with *Microbacterium* sp. The strain identified by the rRNA 16 S sequence and deposited in the Genbank database with the following access number KX002029.

### 3.2 Evaluation of the *Microbacterium* sp. M87 to biosurfactants production

The isolated *Microbacterium* sp. M87 has positive results for oil biodegradation within 24 h, using the indicator 2,6 indophenol. It promoted the drop collapse of the oil in 1, 5 min e 72 h. de observação, estes resultados mostraram que o colapso da gota de petróleo foi satisfatório, pois manteve a gota dispersa por todo o período observado, afforded 1.7 cm or 52% of diesel emulsification index and water surface tension at 40.53 mN /m using the fermented cell-free extract for 96 h (Table 01). These results showed to be higher-valued than those found for *M. aquimaris*, reported by Hassanshahian, Giti and Simone (2011) as probable production of biosurfactants and bioemulsifiers in obtaining hydrocarbons with 5% emulsion, and 43.54 mN/m surface tension. The same kind of work done by Supaphol et al. (2006) and Kim et al. (2013) showed potential in the biodegradation of hydrocarbon compounds and assimilation of heavy metals such as cadmium, as well as growth in lubricating oil, having, in fact, physiological characteristics in the use of hydrocarbons. The mentioned authors drew attention to the need and importance of further study on the production and characterization of biosurfactants or bioemulsifiers due to the paucity of reports addressing this genus.

Important to realize that using the crude extract produced by the microorganism under study, produced higher diesel emulsion than reducing the surface tension of water, this may be related to the molecular

weight of the biosurfactant present in the crude extract. On the other hand, this is not always a correlation between emulsion, surface tension and the drop collapse is perceived to check the production of biosurfactant by different micro-organisms, as we can see through the work.

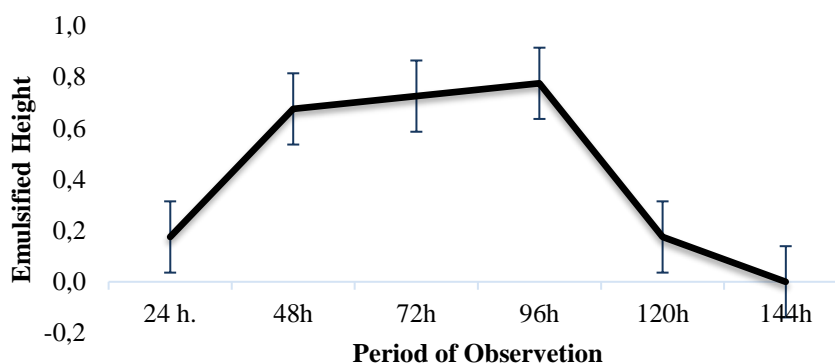
**Table 01.** Evaluation of *Microbacterium sp. M87* as producer of biosurfactants, using different tests

Isolate	Test with 2,6 indophenol (DCPIP)		Drop Collapse			Diesel oil Emulsion		Surface Tension
	24 h	48 h	0 s	1 min	5 min	72 h	24 h	
M87	+	+	-	+	+	+	1.7 cm	40.53 mN/m
Controls:								
BH+DS*	-	-						
BH+DS*			-	-	-	-		
SDS**							2.0 cm	
MCS***								48.87 mN/m

Subtitle: (-) negative / (±) slow collapse / (+) rapid collapse, mN/m = milliNewton/meter. \*BH + diesel oil with no bacteria used as negative control in indophenol and Drop Collapse tests. \*\*Sodium Dodecyl Sulfate in concentration 1 M used as control in emulsion test. \*\*\* Growth medium without the bacteria used as control in surface tension test

### 3.3 Biosurfactants production slope for the isolated *Microbacterium sp. M87*

It has been put to a test to evaluate the production of biosurfactants over time. For that, a production slope analysis was performed (Figure 01). Bezerra et al. (2013) used this method aiming same goals of this work. The production took place in the stationary phase, starting within 48 h and remaining constant for up to 96 h, this feature was also observed by Pinto, Costa and Martins (2009) when using different microorganisms in mixed cultures of *Corynebacterium aquaticum* and *Bacillus sp.* and pure culture of *B. subtilis* and *B. pumillus*. The production slope is justified by the discovery of the relationship between production time and the microorganism of the present work.



**Fig. 01.** Biosurfactant yield slope for isolated *Microbacterium sp. M87*

Slope data were used to perform the production subsequent isolation of biosurfactant in the set time of 96 h. The supernatant of fermentation medium used for growth of the bacterium was subjected to extraction with chloroform: methanol. We observed the formation of two distinct phases, the organic collected and evaporated ones.

The material yield after lyophilization was 3 g/L at 96 h of fermentation. Sousa et al. (2014), using *B. subtilis* stationary culture, a known producer of biosurfactant, produced a concentration of 3.47 g / L in 54 h. The comparison between the different data presented show us that the isolated of this work has potential in this same direction.

The biosurfactant was purified from 250 mg of lyophilized extract in chromatographic column. 15 fractions were obtained. The masses of these fractions ranged from 18 to 916 mg.

The five most representative fractions were subjected to surface tension test as an assessment parameter of the presence of biosurfactants (Table 02). Fraction 1 was the best to reduce the water surface tension, the second best result was observed with the fraction 3. It is possible that this fact is related to the concentration of low molar mass of this biosurfactant in these fractions; according to Bento, Camargo and Gaylarde (2008), it may cause the water surface reduction. Apart from fraction 4, all others have reduced surface tension below 40 mN/m. The fractions tested in this study were higher than 80 tween commercial surfactant used as control and close to the values recorded for the SDS (Sodium dodecyl sulfate) commercially used synthetic surfactants (Table 02). On the other hand, it is observed that with the fractionation of biosurfactants present in the crude extract were separated low and high molecular weight, low molecular weight would explain the reduction of surface tension below 40 mN / m for the majority of the fractions obtained.

**Table 02.** Evaluation of the surface tension of different fractions obtained from the lyophilized *Microbacterium* sp. M87 extract

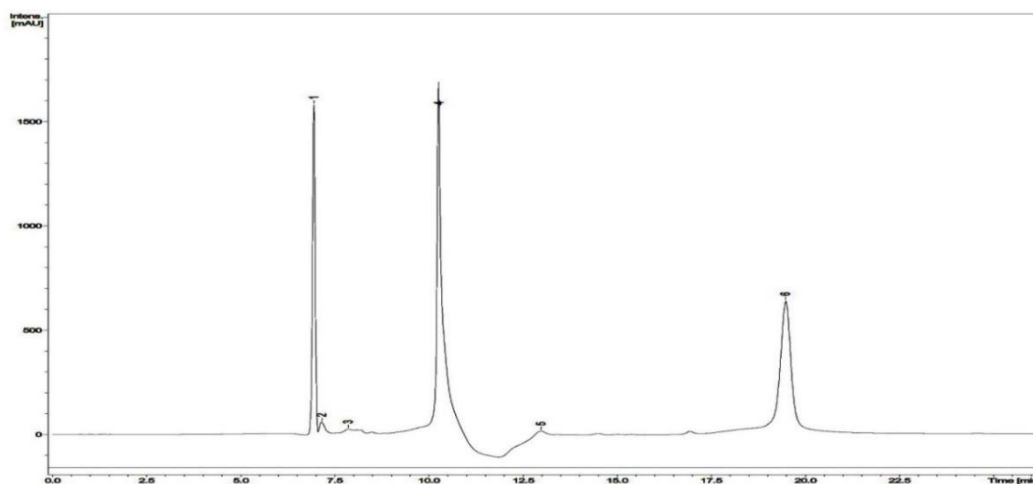
	Fraction				
	1	2	3	4	5
Tension	34.17 mN/m	35.85 mN/m	35.20 mN/m	53.92 mN/m	36.48 mN/m
Masses	205 mg	358 mg	916 mg	135 mg	144 mg
	Controls				
SDS	31.59 mN/m / 3453 mg				
Tween 80	39.79 mN/m / 3453 mg				
Distilled Water	71.25 mN/m				

mN/m = miliNewton/metro

### 3.4 Preliminary structural characterization of the biosurfactant produced by strain M87

The chemical composition of this biosurfactant in the fraction 1 was analyzed by three different techniques (UFLC / MS, 1H NMR and FT-IR). For the analysis of LC/MS, six peaks were observed; the most representative peaks were 1, with 6.5 minutes, followed by Peak 4 with 10.5 minutes, and peak 6 with 19.5 minutes retention (Figure 02).

Data from the analysis of LC/MS plotted in (Table 02) and combined with those in Figure 03 indicated via the respective molecular weights, possible chemical structures with a predominant presence of carbon-hydrogen bond or carbon-oxygen bond, possibly forming a long carbon chain. Thus, according to Bento, Camargo e Gaylarde (2008), this compound produced by this bacterium, fits the type of fatty acid lipid classification. These data were confirmed by FT-IR and 1 H NMR techniques.

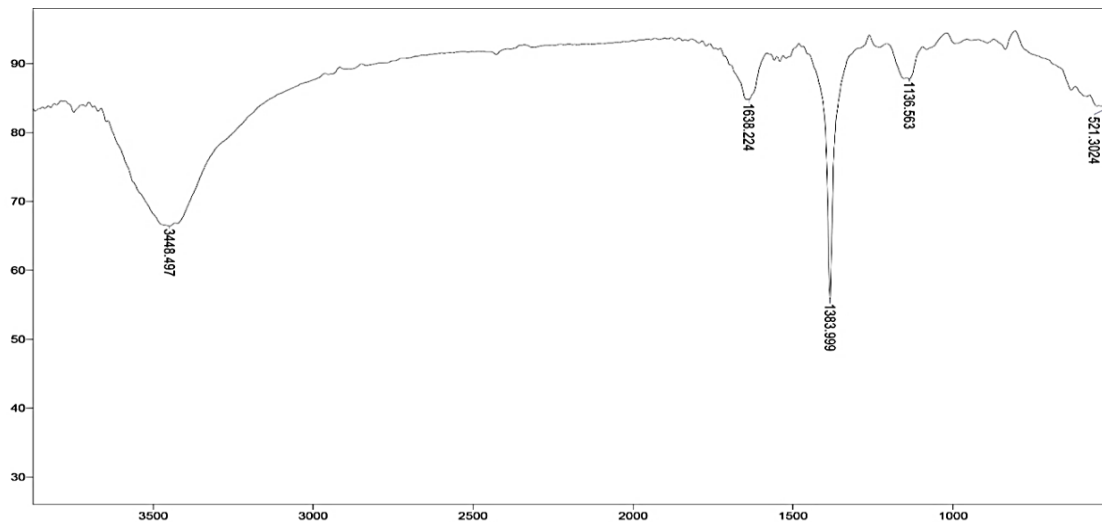


**Fig. 02.** Fraction 1 Analysis by HPLC/MS, showing the main peaks corresponding to present substances.

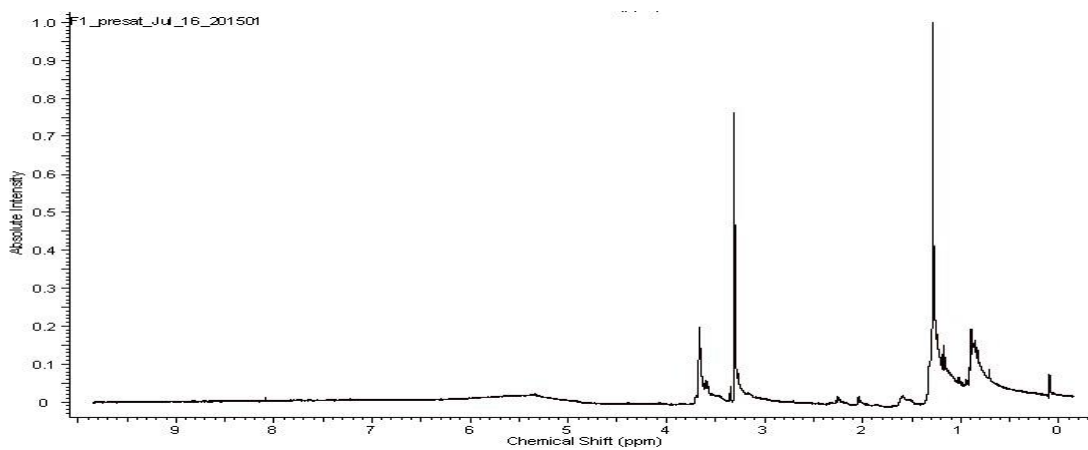
**Table 03.** Chemical characterization of the biosurfactant produced by *Microbacterium* sp. M87

Peaks	Molecular weight (m/z)	Chemical Structure	Retention Time (minutes)
1	1106.8051	$C_{60}H_{114}O_{17}$	6.5
2 and 4	1133.8	$C_{69}H_{113}O_{12}$	6.5, 10.5
3, 5 and 6	761.5944	$C_{39}H_{85}O_{13}$	7.5, 13.0, 19.0
	465	$C_5H_{53}O_{22}$	

In the Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) the presence of absorption in  $1136\text{ cm}^{-1}$  corresponds to the region (C-H),  $1383\text{ cm}^{-1}$  corresponds to the aliphatic region (-CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>) and  $1638\text{ cm}^{-1}$  corresponds to C = O bond, the absorbance of  $3448\text{ cm}^{-1}$  represents the CH bond stretching or O-H stretch. N-H stretching was not observed in this spectrum, which indicates it to probably have no peptide residues Figure 4. Evidenced absorptions were similar to those obtained by Jara, Rosilene and Campos-Takacic (2013); and Sousa et al. (2014) in characterization of a tensoactive agent produced by *Geobacillus stearothermophilus* and a biosurfactant produced by *B. subtilis*. Camacho-Chab et al. (2013) studied genus *Microbacterium* isolated from marine environment and proved the presence of glycoproteins able to emulsify aromatic hydrocarbons and oils. The bacterium isolated from the marine environment differs from the bacterium isolated in this study regarding the absorption bands obtained by FT-IR, probably because of different environments it is possible that the freshwater-isolated one produces a distinct compound, but with Similar activities regarding emulsification. On the other hand, it is clear that microorganisms from environments with historical contamination by oil and its derivatives have physiological mechanisms that actually help them in capturing hydrocarbons used as carbon source and can turn these substrates into several by-products, with one of them being the biosurfactant found in this study



**Fig. 03.** Magnetic resonance in Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) of the biosurfactant produced by the isolated *Microbacterium sp. M87*



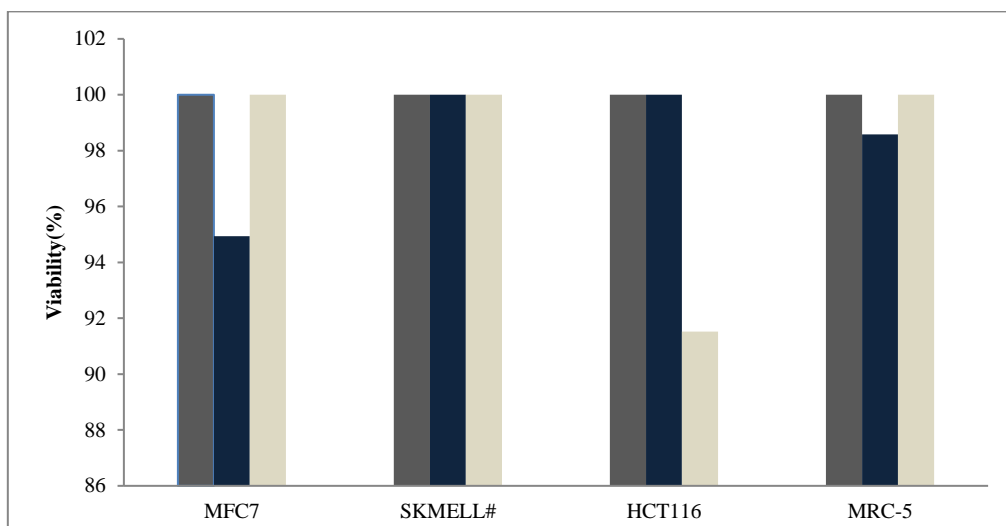
**Fig. 04.** <sup>1</sup>H NMR spectrum of the biosurfactant produced by *Microbacterium sp. M87*

The hydrogen spectrum of Figure 04 confirmed the presence of bond between hydrogen and carbon due to the chemical shift. The shift at 3.66 ppm indicates the presence of structural CH<sub>3</sub>O, followed by 1.25 - 1.55 ppm showing aliphatic presence of CH<sub>2</sub> groups and in 5.3 ppm the presence of CHO groups; these shifts and the presence of the respective groups agree with the work of Liu, Yang and Mu (2008) in the identification of isolated lipopeptide *B. subtilis*. It can be argued by the chemical shifts, the isolate M87, to have a carbonic structure similar to that of the biosurfactant produced by *B. subtilis* often reported as a surfactin producer.

The biosurfactant present in the given fraction is probably the fatty acid type, long chain anionic because it has not shown the presence of other structures other than carbon and hydrogen through different used techniques

### 3.5 Citotoxicity test

The results of the cytotoxicity assay are plotted in Figure 05 for the aqueous extract and lyophilized *Microbacterium sp. M87*, showed no toxicity to different concentrations used. Decesaro et al. (2013) also found no toxic activity to fungi or bacteria bioemulsifiers tested in their work.



**Fig. 05.** Cytotoxicity test using aqueous and lyophilized extract from isolated *Microbacterium sp.* M87

#### 4 CONCLUSION

This is certainly the first research effort regarding the chemical structural identification of a biosurfactant produced by genus *Microbacterium sp.* from environments impacted by oil in the Amazon. The production of 3g/L biosurfactant microorganism proved to be satisfactory to use oil diesel as the sole carbon source in shake flasks. According to the analysis by means of (HPLC, FT-IR and <sup>1</sup>H-NMR) revealed the presence of aliphatic groups (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) and the presence of O-H stretch probably indicating the presence of fatty acids. New studies need to be conducted with the selected strain used alternative means of low cost, combined with different pHs and temperatures, in order to improve the production of biosurfactant. These results can be considered as a potential bioremediation or processor of cosmetics or food industry since the biosurfactant produced did not show toxicity by the Alamar Blue method.

#### ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank CAPES for the aid provided so as to develop this project.

#### REFERENCES

- Ayres, M., Ayres, JM., Ayres, DL., Santos, AA (2007). BIOESTAT - Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Mamiurá. Belém: PA.Bio-Médicas.
- Azevedo, JL (2008). Genética de microrganismos. Goiânia, BR: Universidade Federal de Goiânia.
- Bento, MF., Camargo, FA., Gaylarde, CC (2008). Biossurfactantes. In Melo, I. S., Azevedo, JL. (Ed.) Microbiologia Ambiental. (pp.152-184). Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente.
- Bezerra, MS., Holanda, VCD., Amorim, JA., Macedo, GR., Santos, ES (2012). Produção de biotensioativo utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (p.a.) e resíduo agroindustrial (manipueira) como substrato. *Holos*, 28(1), 14-27.
- Camacho-Chab, JC., Guézennec, J., Chan-Bacab, MJ., Ríos-Leal, E., Siquin, C., Muñoz-Salazar, R., Susana, C., Rosa-García DL, Reyes-Estebanez, M., Ortega-Morales, B. O. 2013. Emulsifying Activity and Stability of a Non-Toxic Bioemulsifier Synthesized by *Microbacterium sp.* MC3B-10. *International Journal Molecular Science*, DOI:10.3390/ijms140918959.
- Colla, LM & Costa, JV (2003). Obtenção e aplicação de biossurfactantes. *Vetor*, 13, 85-103.
- Cooper, DG & Goldenberg, BG (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Application Environmental Microbiology*, 53(2), 224-229.
- Decesaro, A., Rigon, MR, Thomé, A., Colla, LM (2013). Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. *Química Nova*, 36(7), 947-954.

- Dittmer, JC & Lester, RL (1964). A simple, specific spray for the detection of phospholipid on thin-layer chromatograms. *Journal of Lipid Research*, 5, 126-127.
- Hanson, KG, Desai, DJ, Desai, Anjana J. (1993). A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology techniques*, 7(10), 745-748.
- Hassanshahian, M., Giti, E., Simone, C. (2011). Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin*, doi:10.1016/j.marpolbul.2011.11.006.
- Horowitz, S., Gilbert, N., Griffin, M. (1990). Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. *Journal of Industrial Microbiology*, 6, 243-248.
- Isola, J., De Vries, S., Chu, L. (1994). Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Journal Pathology*, 145(6), 1301-1308.
- Jackisch-Matsuura, AB, Santos, LS, Eberlin, MN, Faria, AF, Grossman, MJ, Durrant, LR (2014). Production and characterization of surface-active compounds from *Gordonia amicalis*. *Brazilian Archives Biology Technology*, 57, 138-144.
- Jara, M., Rosileide, FS, Campos-Takacic, GM (2013). Physicochemical characterization of tensio-active produced by *Geobacillus stearothermophilus* isolated from petroleum-contaminated soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101, 315-318.
- Kim, EJ, Fathoni, A, Jeong, GT, Jeong, HD, Nam, TJ, Kong, IS, Kim, JK (2013). *Microbacterium oxydans*, a novel alginate and laminarin-degrading bacterium for the reutilization of brown-seaweed waste. *J Environ Manage*, 30(130), 153-9.
- Kumar, CG, Mamidyala, SK, Sujitha, P., Muluka, H., Akkenapally, S. (2012). Evaluation of critical nutritional parameters and their significance in the production of rhamnolipid biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R. *Biotechnology Progress*, 28(6), 1507-16.
- Liu, XY, Yang, SZ, Mu, B Z (2008). Isolation and characterization of a C12-lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* HSO 121. *J. Peptide. Science*, 14, 864-875.
- Nakayama, GR, Caton, MC, Nova, MP, Parandoosh, Z. (1997). Assessment of the alamar blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. *Journal of Immunology Methods*, 204, 205-208.
- Neerati, R., Yanamala, V. (2013). Identification and Characterization of Lipids by TLC in Parotoid Gland Secretion and Its Extract of *Bufo melanostictus* (Schneider). *International Journal Pharmaceutical Sciences*, 23(2), 117-121.
- Pinto, MH, Martins, RG, Costa, JAV (2009). Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. *Química Nova*, 32(8), 2104-2108.
- Rapp, P. & Backhaus, S. (1992). Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeast, and bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 4, 938-943.
- Reis, RL, Leão, NS, Souza, AF, Silva, GK, Luna, MA, Alves CA, Okada, K. (2015). Evaluation of biotechnological potential of *Aspergillus parasiticus* ucp 1281 in the wastewater biotreatment of Dairy industry and lipids production. *E-xacta*, 8(1), 31-42.
- Sourav, D., Susanta, M., Ghosh, A., Saha, R., Saha, BA (2015). A review on natural surfactants. *Royal Society of Chemistry*, DOI: 10.1039/c5ra11101c.
- Sousa, M., Dantas, IT, Felix, AKN, Sant'Ana, HB, Melo, VMM, Gonçalves, LRB (2014). Crude glycerol from biodiesel industry as substrate for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57, 295-301.
- Suaphol, S., Panichsakpatana, S., Trakulnaleamsai, S., Tungkananuruk, N., Roughjanajirapa, P., O'Donnell, AG (2006). The selection of mixed microbial inocula in environmental biotechnology: Example using petroleum contaminated tropical soils. *Journal Microbiology Methods*, 65, 432-41.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
- Wongwongse, W., Promchat, C., Onruthai, P., Wanwasan, W., Promchat, C., Onruthai, P. (2005). Abilities and genes for PAH biodegradation of bacteria isolated from mangrove sediments from the central of Thailand. *Marine Pollution Bulletin*, 74, 95-104.