

MAIKE ROSSMANN

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E PROPRIEDADES
TENSOATIVAS DE BIODERIVADOS EM MEIOS À BASE
DE MELAÇO E MANIPUEIRA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MAIKE ROSSMANN

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E PROPRIEDADES
TENSOATIVAS DE BIOSSURFACTANTES EM MEIOS À BASE
DE MELAÇO E MANIPUEIRA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 30 de julho de 2008.

Profa. Ann Honor Mounteer

Prof. Antônio Galvão do Nascimento

*Prof. Hilário Cuquetto Mantovani
(Co-orientador)*

*Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Co-orientador)*

*Prof. Marcos Rogério Tótola
(Orientador)*

Agradeço a Deus por eu ter amigos.

Dedico:

A minha família, meu alicerce.

A Paulo Ricardo Carvalho de Souza, a Fabiane de Mesquita Batista e ao Péricles Leonardo Fernandes.

Muito Obrigada.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	1
<u>CAPITULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	
1.1 RECUPERAÇÃO DO ÓLEO E A MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery)	4
1.2 SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES	6
1.3 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	7
1.4 PRODUÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES A PARTIR DE SUBSTRATOS ALTERNATIVOS	9
1.5 USOS E POTENCIALIDADES DA MANIPUEIRA E DO MELAÇO	10
1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
<u>CAPITULO 2. SELEÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES EM MEIOS À BASE DE MELAÇO E MANIPUEIRA</u>	
RESUMO	20
2.1 INTRODUÇÃO	21
2.2 MATERIAL E METODOS	23
2.2.1 Isolados bacterianos	23
2.2.2 Meios de Cultura	23
2.2.3 Preparo do inóculo e condições de cultivo	26
2.2.4 Determinação da tensão superficial dos extratos bacterianos livres de células	27
2.2.5 Delineamento experimental e análises estatísticas	27
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
2.4 CONCLUSÕES	37
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
<u>CAPITULO 3. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR ISOLADOS BACTERIANOS E CULTURAS MISTAS</u>	
RESUMO	44
3.1 INTRODUÇÃO	45
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	47
3.2.1 Isolados bacterianos e composição das culturas mistas	47
3.2.2 Meios de cultura	47
3.2.3 Preparo do inóculo e condições de cultivo	49
3.2.4 Determinação da tensão superficial dos extratos bacterianos livre de células	50
3.2.5 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	51

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.4 CONCLUSÕES	71
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
<u>CAPITULO 4.</u> ESTUDO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO PELO ISOLADO <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBBMA 88 A EM MEIO COMPOSTO POR MELAÇO E MANIPUEIRA	
RESUMO	76
4.1 INTRODUÇÃO	77
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	79
4.2.1 Microrganismos	79
4.2.2 Meios de cultura	79
4.2.3 Preparo do inóculo e condições de cultivo	81
4.2.4 Propriedades físico-químicas dos biossurfactantes	81
4.2.4.1 Diluição micelar crítica (DMC) do extrato bacteriano livre de células	81
4.2.4.2 Atividade de emulsificação e estabilidade da emulsão	82
4.2.4.3 Avaliação do efeito da salinidade, da temperatura e do pH na atividade dos biossurfactantes	82
4.3 RESULTADO E DISCUSSÃO	83
4.3.1 Tensão superficial e diluição micelar crítica (DMC)	83
4.3.2 Atividade de emulsificação e estabilidade da emulsão	84
4.3.3 Efeito da salinidade, da temperatura e do pH na atividade do biossurfactante	85
4.4 CONCLUSÕES	92
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

INTRODUÇÃO GERAL

Surfactantes (**surface active agents**) é a denominação dada a compostos comumente presentes em sabões e detergentes. São moléculas anfifílicas, as quais apresentam regiões de afinidade com a água e com óleos, ou seja, um domínio hidrofílico e um hidrofóbico. Usualmente, o domínio hidrofóbico é um hidrocarboneto, enquanto que o hidrofílico pode ser não-iônico, iônico (catiônico ou aniônico) ou anfotérico. Por serem anfifílicos, são moléculas ativas de superfície, ou seja, ao serem adicionados em sistemas água-óleo ou água-ar se posicionam na interface, direcionando suas regiões de acordo com as afinidades das mesmas para com os componentes do sistema (SABATINI *et al.*, 2006).

Biossurfactantes são produzidos por diversos microrganismos e podem apresentar diferentes estruturas químicas e propriedades de superfície. Geralmente, a estrutura inclui um domínio hidrofílico composto de aminoácidos ou peptídeos, ânions ou cátions, mono-, di- ou polissacarídeos; e um domínio hidrofóbico, composto freqüentemente de ácidos graxos saturados, insaturados ou hidroxilados (GEORGIU *et al.*, 1992). Essa diversidade leva à inferência de que diferentes grupos de biossurfactantes possuem diferentes papéis naturais no crescimento dos microrganismos produtores (RON e ROSENBERG, 2001). A produção de biossurfactantes por alguns microrganismos é uma resposta fisiológica que possibilita: (i) o aumento na biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos (BICCA *et al.*, 1999; BOGNOLO, 1999; CALVO *et al.*, 2004); (ii) a ligação com metais pesados, o que reduz a toxicidade no meio (HERMAN *et al.*, 1995; MULLIGAN *et al.*, 1999; SANDRIN *et al.*, 2000); (iii) atividade antimicrobiana; (iv) aumento da patogenicidade e (v) fixação ou desprendimento de substratos (DESAI e BANAT, 1997).

Surfactantes sintetizados quimicamente têm sido usados na indústria de óleo para auxiliar na limpeza de derramamentos, assim como na recuperação avançada do óleo (EOR) em reservatórios naturais, após os processos de recuperação primária e secundária. Contudo, esses compostos não são biodegradáveis e podem ser tóxicos a diversos organismos; ao contrário, os biossurfactantes possuem propriedades equivalentes de emulsificação, são biodegradáveis e usualmente menos tóxicos (ZAJIC *et al.*, 1977; CHA, 2000; MOHAN *et al.*, 2006). Essas características favorecem a decisão da sua utilização na mobilização de óleo pesado, no transporte de petróleo em oleodutos, no controle de derramamentos de óleo, na biorremediação de solos e areias e

na recuperação avançada do óleo melhorada por microrganismos (MEOR) (BANAT, 1995; DESAI e BANAT, 1997; CAMEOTRA e MAKKAR, 1998; BANAT *et al.*, 2000; SINGH *et al.*, 2007).

A MEOR é uma tecnologia de recuperação terciária baseada na utilização de microrganismos e/ou seus metabólitos para recuperação do óleo residual (BANAT, 1995), com elevado potencial para aplicação de biossurfactantes em larga escala. Uma das variantes da MEOR é a produção de polímeros e surfactantes no interior do reservatório, a partir da microbiota nativa ou de isolados bacterianos halóctones tolerantes às condições físicas e químicas do ambiente. Nesse caso, o objetivo é diminuir a tensão entre a interface óleo-rocha e, com isso, favorecer a recuperação do óleo (BANAT *et al.*, 2000).

Espécies dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* têm se destacado como os microrganismos produtores mais utilizados em pesquisas e pelos resultados encontrados. O gênero *Bacillus* é descrito na literatura pela sua aplicabilidade na recuperação avançada do petróleo melhorada por microrganismos (MEOR) (BANAT, 1993; TABATABAEE *et al.*, 2002; SEPAHY *et al.*, 2005), em razão da habilidade em produzir endósporos (GEORGIOU *et al.*, 1992; McINERNEY *et al.*, 2005), que são mais efetivos no transporte através dos poros da rocha-reservatório do que células vegetativas, em decorrência de sua reduzida dimensão (JANG *et al.*, 1983), entre outros fatores. Também o potencial da *Pseudomonas* tem sido explorado para aplicação na MEOR e em outros setores da cadeia do petróleo, dadas as propriedades ativas de superfície e a estabilidade das emulsões obtidas com os biossurfactantes produzidos por espécies desse gênero (LI *et al.*, 2002; DAS e MUKHERJEE, 2005; OKPOKWASILI e IBIENE, 2006).

A utilização de biossurfactantes ainda é limitada pela competição com surfactantes de origem sintética, especialmente quando se considera a capacidade para atender às necessidades da aplicação pretendida, a funcionalidade e o custo. Altos custos de produção são incompatíveis com aplicações de recuperação de óleo, que requerem grandes quantidades de surfactantes. Nesse sentido, para o desenvolvimento de biossurfactantes para aplicação em MEOR, é fundamental que custos de produção sejam reduzidos, o que pode ser em parte obtido com o uso de matérias-primas de baixo custo, a exemplo de resíduos agroindustriais (MAKKAR e CAMEOTRA, 1999, 2002a,b; MERCADE e MANRESA, 1994; MUKHERJEE *et al.*, 2006). Vários desses substratos, incluindo resíduos de óleo, soro de leite (DUBEY e JUWARKAR, 2001), manipueira (NITSCHKE *et al.*, 2004; NITSCHKE e PASTORE, 2006) e subprodutos da fabricação do álcool (DUBEY e JUWARKAR, 2001) e do açúcar (PATEL e DESAI, 1997; NITSCHKE *et al.*, 2004; RASHEDI *et al.*, 2005), como o

melaço (ROUKAS, 1998), têm sido avaliados quanto a sua potencialidade em sustentar a produção de biossurfactantes.

O melaço é um subproduto da indústria de beneficiamento de cana-de-açúcar que é vendido a baixo custo para complementação nutricional de ração animal ou, em alguns casos, descartado como resíduo. Consiste de água, sacarose (47-50% p/p), proteínas, vitaminas, aminoácidos, ácidos orgânicos e metais como ferro, zinco, cobre, manganês, magnésio e cálcio, principalmente. A manipueira é o líquido residual resultante do processo de fabricação da farinha de mandioca ou da extração da sua fécula. Os nutrientes presentes neste resíduo são açúcares e sais minerais, sendo a sacarose o principal açúcar juntamente com significativas concentrações de frutose e glicose (NITSCHKE e PASTORE, 2006). O descarte desses resíduos, que podem ser considerados como substratos compatíveis para processos biotecnológicos, causa problemas ambientais em decorrência da alta carga orgânica.

A natureza da fonte de carbono (GEORGIU *et al.*, 1992; CAMEOTRA e MAKKAR, 1998; MAKKAR e CAMEOTRA, 1998; ILORI *et al.*, 2005), as concentrações de N, P, Mg, Fe e Mn no meio (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998; MAKKAR e CAMEOTRA, 1998; ILORI *et al.*, 2005) e as condições de cultivo, incluindo pH, temperatura, agitação e taxa de diluição (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998; ILORI *et al.*, 2005), afetam o processo de produção, a quantidade e a composição dos biossurfactantes. Como exemplo, relata-se que a limitação de nitrogênio aumenta a produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* estirpe BS-2 (MULLIGAN e GIBBS, 1989) e por *Bacillus subtilis* (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998). De forma similar, a adição de ferro e manganês ao meio de cultura aumenta a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002a).

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de se avaliar a produção de biossurfactantes por culturas bacterianas puras e mistas, em meios à base de manipueira e melaço. Os biossurfactantes foram caracterizados quanto à capacidade de reduzir a tensão superficial do meio aquoso, quanto à capacidade de formar emulsões estáveis com querosene e quanto à manutenção dessas características em resposta a variações de pH, salinidade e temperatura.

CAPITULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 RECUPERAÇÃO DO ÓLEO E A MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery)

O processo de extração do petróleo é realizado em sua grande parte por técnicas denominadas de recuperação primária e de recuperação secundária do óleo. A recuperação primária depende apenas do fluxo natural do óleo, formado em razão da diferença de pressão entre o interior do reservatório e a atmosfera externa. Isso faz com que o método se torne inviável a partir do momento em que ocorre o equilíbrio das pressões e a conseqüente diminuição ou interrupção do fluxo de óleo. Nesse momento, são adotados os métodos de recuperação secundária, que têm o objetivo de manter uma pressão interna suficiente e adequada para impulsionar o óleo para fora por meio da injeção de gás ou água ao reservatório. Em determinados casos, o baixo rendimento desses métodos de extração é o principal ponto negativo, pois possibilitam a mobilização de apenas 33 a 50% do óleo contido nos reservatórios (YOUSSEF et al., 2007).

A recuperação avançada do óleo (enhanced oil recovery - EOR) é a terceira alternativa que tem sido utilizada para aumentar o rendimento e adiar o declínio da produção dos reservatórios. Dentre os métodos de EOR, o de recuperação avançada do óleo melhorada por microrganismos, denominado MEOR (microbial enhanced oil recovery), é o de menor custo de implementação em larga escala, quando comparado aos dos métodos térmicos, químicos e de miscibilidade. A MEOR sendo baseada na utilização de microrganismos e/ou de seus metabólitos, desencadeou na última década, estudos voltados para produção destes metabólitos microbianos a partir de fontes renováveis e de baixo custo têm como objetivos fazer com que esse método seja economicamente viável e ainda mais promissor (PATEL e DESAI, 1997; FOX e BALA, 2000; DUBEY e JUWARKAR, 2001; NITSCHKE *et. al.*, 2004; MANEERAT, 2005; RAMNANI *et al.*, 2005; RASHEDI *et al.*, 2005; MUKHERJEE *et al.*, 2006; NITSCHKE e PASTORE, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2006).

Dentre os metabólitos microbianos e os mecanismos por eles desempenhados incluem-se: (i) gases, como o CO₂ e o CH₄, que aumentam a pressão no reservatório ou

ainda diminuem a viscosidade do óleo cru; (ii) ácidos, como o acético, o butírico e o láctico, que degradam a matriz calcária e aumentam a permeabilidade e porosidade; (iii) polímeros, como os polissacarídeos e proteínas, que funcionam como agentes espessantes da água e possibilitam uma retirada de óleo mais eficiente; (iv) solventes, como etanol, butanol e acetona, que reduzem a viscosidade do óleo; (v) bioemulsificantes, como heteropolissacarídeos, que promovem a emulsificação do óleo; (vi) a própria biomassa microbiana, que promove um bloqueio seletivo nas zonas de alta permeabilidade e, finalmente, (vii) os biossurfactantes, como os glicolipídeos e lipopeptídeos, que reduzem a viscosidade do óleo e a tensão interfacial entre o óleo e a rocha (BRYANT, 1987; BANAT, 1995; McINERNEY *et al.*, 2005).

Os biossurfactantes são metabólitos ativos em superfície produzidos por microrganismos quando estes são crescidos em substratos hidrossolúveis ou óleo. Seu mecanismo de ação reduz as forças capilares, que impedem a movimentação do óleo através dos poros da rocha, por meio da redução da viscosidade e da tensão interfacial óleo-rocha e óleo-fluido de injeção. As principais estratégias para a utilização destes compostos na recuperação do petróleo são três, a saber: (1) adição de nutrientes selecionados para o reservatório em questão, para estimular o crescimento da microbiota local produtora de biossurfactantes; (2) injeção de células de uma cultura metabolicamente ativa dentro do reservatório, acompanhada da injeção de nutrientes necessários ao seu crescimento, com subsequente propagação na rocha reservatório, MEOR *in situ*; (3) e produção de biossurfactantes em biorreatores, em escalas industriais, seguida da adição desses compostos no reservatório juntamente com a água de injeção, MEOR *ex situ* (BANAT, 1995). Experimentos desenvolvidos em laboratório (OKPOKWASILI e IBIENE, 2006) e em campo (LI *et al.*, 2002) tem demonstrado aumentos satisfatórios na recuperação de óleo com a utilização de biossurfactantes.

Características dos reservatórios, tais como ausência de oxigênio, estrutura geológica (porosidade e permeabilidade) e condição extrema de temperatura (40-70 °C), salinidade (2-10%), pH (4-8) e pressão (6,5-21 kPa) devem ser consideradas para escolha da melhor estratégia de MEOR, bem como do microrganismo a ser aplicado (YAKIMOV *et al.*, 1997).

1.2 SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES

Surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção polar e uma apolar. A porção polar ou hidrofílica, solúvel em água, pode ser iônica, não iônica ou anfotérica, ou seja, exibir características aniônicas ou catiônicas dependendo das condições de pH da solução aquosa na qual estão inseridos. A porção apolar ou hidrofóbica, insolúvel em água, porém solúvel em lipídios, é geralmente um hidrocarboneto (DESAI e BANAT, 1997).

Em função da presença destes dois grupos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir preferencialmente nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade, tais como interface líquido-líquido e ar-líquido. A formação de um filme molecular nas interfaces reduz a tensão nesta região, sendo esta uma característica única dos surfactantes. Além disso, surfactantes formam microemulsões onde hidrocarbonetos podem se solubilizar em água, e vice-versa (BANAT *et al.*, 2000). A redução da tensão interfacial torna estes compostos adequados para várias aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases. Muitos surfactantes são sintetizados quimicamente a partir do petróleo. A maioria também é tóxica ao ambiente, não facilmente degradável e seu processo de produção e seus subprodutos podem ser ambientalmente danosos (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002b).

A denominação biossurfactantes é dada a um grupo estruturalmente diverso de subprodutos metabólicos de origem microbiana. Eles possuem estrutura e características comuns aos surfactantes sintéticos, isto é, reduzem a tensão interfacial e possuem alta capacidade emulsificante (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998). A redução da tensão interfacial promovida por estes compostos utiliza o mesmo mecanismo dos surfactantes sintéticos (DESAI e BANAT, 1997).

Biossurfactantes são produzidos por diversos microrganismos e possuem diferentes estruturas químicas e propriedades de superfície. Essa diversidade leva à inferência de que diferentes grupos de biossurfactantes possuem diferentes papéis naturais no crescimento dos microrganismos produtores, a exemplo da promoção da motilidade, sinalização e diferenciação celular; emulsificação e solubilização de compostos insolúveis em água, disponibilizando-os; aderência ou liberação da célula de superfícies; formação de biofilmes, aumento de patogenicidade e atividade antibiótica (HERMAN *et al.*, 1995; DESAI e BANAT, 1997; BICCA *et al.*, 1999; BOGNOLO,

1999; MULLIGAN *et al.*, 1999; SANDRIN *et al.*, 2000; CALVO *et al.*, 2004; SINGH *et al.*, 2007; SEN, 2008).

Apesar dessa diversidade de funções, propriedades e composição química algumas características são comuns à maioria dos biossurfactantes. Algumas dessas características representam vantagens sobre surfactantes convencionais (BOGNOLO, 1999), dando a eles destaque. Os biossurfactantes são: (i) mais eficientes e efetivos do que surfactantes convencionais, pois produzem menor tensão superficial com menores concentrações (COOPER e PADDOCK, 1984; BOGNOLO, 1999); (ii) mais estáveis quanto as variáveis de temperatura, pH e salinidade, podendo ser utilizados em ambientes com condições extremas (BANAT, 1993; MAKKAR e CAMEOTRA, 1998; DAS e MUKHERJEE, 2005; ILORI *et al.*, 2005; SEPAHY *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2007); (iii) facilmente degradáveis na água e no solo, o que os torna adequados para uso em biorremediação e tratamento de resíduos (DESAI e BANAT, 1997); (iv) e específicos, pois a grande diversidade química possibilita a escolha para aplicações específicas (DESAI e BANAT, 1997). Além disso, possuem baixa toxicidade (SCHIPPERS *et al.*, 2000; MAKKAR e ROCKNE, 2003; EDWARDS *et al.*, 2003), podem ser sintetizados em meio com uso de fontes de carbono renováveis (MAKKAR e CAMEOTRA 1999; MAKKAR e CAMEOTRA, 2002b; MANEERAT, 2005) e ter sua estrutura química e suas propriedades físicas modificadas por meio de manipulações genéticas, biológicas ou químicas, permitindo o desenvolvimento de produtos para necessidades específicas (MULLIGAN e GIBBS, 1989; MUKHERJEE *et al.*, 2006).

1.3 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

A produção de biossurfactantes pelos microrganismos esta intimamente ligada às condições ambientais e nutricionais fornecidas. Todos os fatores que influenciam o crescimento microbiano afetam também diretamente a produção de biossurfactante (DESAI e BANAT, 1997; MUKHERJEE e DAS, 2005). Temperatura, pH, agitação e disponibilidade de oxigênio afetam a produção de biossurfactantes pelo seu efeito sob o crescimento e as atividades celulares (DESAI e BANAT, 1997). Fontes e concentrações de carbono (MAKKAR e CAMEOTRA, 1999; NITSCHKE *et al.* 2005; MOUSSA *et al.* 2006), nitrogênio (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002a; ILORI *et al.*, 2005; ABOUSEOUD *et al.*, 2007; 2008) e micronutrientes, como ferro (RISMANI *et al.*,

2006; WEI *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008) e manganês (COOPER *et al.*, 1981) são descritos como variáveis que afetam a produção desses compostos.

A modificação no substrato de um mesmo microrganismo frequentemente altera a estrutura do produto e, conseqüentemente, as suas propriedades. Como exemplo, menciona-se o tipo de biossurfactante lipídico produzido por *Bacillus subtilis* em função do tipo de carboidrato do meio de cultura (MAKKAR e CAMEOTRA, 1997; 1998).

A fonte de carbono é importante na produção de biossurfactantes. Os microrganismos utilizam uma grande variedade destas fontes, incluindo substratos miscíveis em água e hidrofóbicos (DESAI e BANAT, 1997). Os biossurfactantes que são produzidos em substratos miscíveis são considerados mais promissores em termos de custo de produção.

Além do carbono, o nitrogênio e o ferro têm sido apontados na literatura como importantes fatores na produção de biossurfactante. Assim, está demonstrado que a máxima produção de ramnolípídeos ocorre após a limitação de nitrogênio no meio, quando a relação carbono/nitrogênio (C/N) encontra-se entre 16:1 a 18:1, enquanto que em meio sem esta limitação (C/N de 11:1) constatou-se a ausência de produção (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1986). Em *Rhodococcus* sp., o crescimento e a produção de biossurfactante é máxima quando é alcançada a concentração de 2,5 g L⁻¹ de nitrato de sódio (ESPUNY *et al.*, 1996). *B. subtilis* MTCC 2423 exhibe preferência por íons nitrato, sendo o nitrato de potássio a melhor fonte para produção (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002a). Também para *Pseudomonas fluorescens* os melhores resultados na produção de biossurfactante e no crescimento da bactéria foram obtidos com o fornecimento de nitrato, entre as três fontes de nitrogênio testadas (ABOUSEOUD *et al.*, 2007; 2008). Esses autores ressaltam a necessidade de controle desse macronutriente para se obter altas concentrações de biossurfactante.

A adição de sais de ferro também é mencionada quanto ao aumento significativo do rendimento de surfactina e de biomassa para *B. subtilis* (COOPER *et al.*, 1981). O efeito da concentração de ferro na produção de biossurfactante por *Rhodococcus* sp. é maior do que no crescimento (ESPUNY *et al.*, 1996). Altas concentrações do íon ferroso, como FeSO₄, promovem redução de biomassa, mas o rendimento do biossurfactante é similar mesmo nessas concentrações (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002a), sendo 0,719 mmol L⁻¹ a concentração ótima de FeSO₄ para a produção de biossurfactante por *B. subtilis* MTCC 2423. Ainda para *B. subtilis*, há relato de aumento de dez vezes na produção de surfactina quando a concentração de ferro no meio foi

aumentada para 4 μM , aumento maior que os atribuídos a cepas geneticamente modificadas (WEI *et al.*, 2004). Para *Pseudomonas* spp., a concentração de 0,1 mmol L^{-1} foi considerada o limite entre a deficiência e a toxicidade do ferro no crescimento dos diversos isolados estudados (SANTOS *et al.* 2008).

1.4 PRODUÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES A PARTIR DE SUBSTRATOS ALTERNATIVOS

O custo de produção é um dos principais fatores que devem ser levados em conta no desenvolvimento de qualquer processo biotecnológico. A produção de biossurfactantes em larga escala depende, portanto, do desenvolvimento de processos de baixo custo, especialmente no que se refere às matérias-primas, uma vez que estas representam até 30% do custo total de produção (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998). A busca pela redução do custo de produção de biossurfactantes e, ao mesmo tempo, pela redução dos problemas ambientais relacionados ao descarte e custos do tratamento de resíduos, tem motivado estudos voltados para a produção desses compostos a partir de fontes de nutrientes renováveis. Uma das principais dificuldades na seleção desses substratos alternativos é encontrar a composição adequada que permita tanto o crescimento celular como o acúmulo do produto de interesse. Em geral, substratos agroindustriais contendo altos níveis de carboidratos ou lipídeos suprem as necessidades para uso como fonte de carbono na produção de biossurfactantes (MERCADÉ e MANRESA, 1994).

Óleo de oliva é apontado como o melhor substrato, quando comparado a n-hexano e glicose, para produção de biossurfactante por *P. fluorescens* (ABOUSEOUD *et al.*, 2007; 2008). Essa é também a melhor fonte de carbono para *Nocardia amarae* (MOUSSA *et al.* 2006). Resíduos de destilaria e soro de leite são igualmente considerados como fontes viáveis para a produção de biossurfactante por *P. aeruginosa* BS2 (DUBEY e JUWARKAR, 2001), bem como os resíduos do processamento de batatas, em substituição às fontes de carbono tradicionais para a produção de biossurfactante por *B. subtilis* (FOX e BALA, 2000). Em óleo ácido de soja como substrato não-convencional para *Pseudomonas aeruginosa* LBI, o biossurfactante produzido é capaz de reduzir tensão superficial do meio para 26,9 mN/m (NITSCHKE *et al.*, 2005). Meio de cultivo suplementado com óleo de canola e glicose para a

produção biossurfactante por *Candida lipolytica* é uma outra possibilidade recentemente estudada (SARUBBO *et al.*, 2007).

A manipueira tem sido considerada como um possível substrato para uso em processo de produção de biossurfactante por bactérias do gênero *Bacillus* (NITSCHKE *et al.*, 2004; 2005). O processo de tratamento da manipueira já foi otimizado (BARROS *et al.*, 2007a) e a produção de biossurfactante testada em escala piloto (BARROS *et al.*, 2007b).

A utilização do melão como fonte de carbono em meio de cultura para a produção de biossurfactante por *P. aeruginosa* tem sido estudada (RASHEDI *et al.*, 2005), inclusive em combinação com a água de maceração do milho, o qual serviu como fonte de nitrogênio (PATEL e DESAI, 1997). Joshi *et al.* (2008) avaliaram a produção de biossurfactantes pelos isolados *Bacillus licheniformis* K51, *B. subtilis* 20B, *B. subtilis* R1 e *Bacillus* HS3 em meios de cultura em que se utilizaram fontes alternativas de carbono, em substituição a carboidratos purificados. Os autores reportaram que as maiores produções foram alcançadas nos meios contendo melão ou soro de queijo como fonte de carbono, e que a produção máxima foi obtida no meio contendo entre 5,0 e 7,0 % (p/v) de melão. Suco de caju também foi relatado como sendo capaz de sustentar a produção de biossurfactantes por *Acinetobacter calcoaceticus* (ROCHA *et al.* 2006; 2007).

1.5 USOS E POTENCIALIDADES DA MANIPUEIRA E DO MELÃO

A manipueira, resíduo líquido gerado nas indústrias de processamento de mandioca, contém altas concentrações de matéria orgânica, notadamente carboidratos, que a torna um poluente de oneroso manejo para estabilização. A preocupação com esse resíduo é bastante significativa, já que a produção da farinha de mandioca gera entre 267 a 419 litros desse resíduo para cada tonelada de raiz processada. Considerando que o Brasil produziu 26,6 milhões de toneladas de mandioca em 2006 (FAOSTAT-FAO, 2008) e que, aproximadamente, 80% do montante produzido é processado em farinhas e fecularias, o volume de manipueira gerado anualmente é extremamente elevado (FERNANDES Jr., 2000). Quando esta água é liberada diretamente em córregos e rios, o amido residual pode causar um rápido crescimento das bactérias, resultando em depleção de oxigênio e de efeitos perniciosos sobre a vida aquática (GOODLEY, 2004).

A disposição no ambiente desse tipo de resíduo tem resultado em freqüentes relatos de problemas de poluição ambiental. Atualmente, a valorização de resíduos por meio do seu aproveitamento em outras atividades tem sido muito utilizadas, podendo

contribuir para a redução da poluição ambiental, bem como permitir a valorização econômica do resíduo, tornando-o um subproduto e, deste modo, agregando valor ao processo de agroindustrialização.

Trabalhos descrevem a manipueira como um adubo foliar tecnicamente eficaz, além de economicamente vantajoso por tratar-se de um produto de baixo custo e abundante em todas as regiões de cultivo e industrialização de mandioca (ARAGÃO e PONTE, 1995). Além disso, a manipueira tem sido apontada como inseticida (PONTE, 1992) e fungicida (SANTOS e PONTE, 1993) podendo reunir, numa só operação, adubação foliar e tratamento fitossanitário.

A manipueira recém-coletada na indústria é descrita como substrato viável para o crescimento da linhagem CCT 0917 de *A. niger*, não apresentando diferença significativa quanto à produção de ácido cítrico em relação ao meio sintético (LEONEL e CEREDA, 1995). É também indicada como substrato capaz de promover o rápido crescimento micelial de *Penicillium* sp. 2025, *Aspergillus* sp. 2038 e *Fusarium oxysporum* 152B (MARÓSTICA Jr. e PASTORE, 2007), além de ser considerada um substrato potencial para produção de etanol, sendo necessários maiores estudos de viabilidade técnico-econômica do processo já que este é um produto de elevado valor agregado (CAMILI e CABELLO, 2008).

O melaço é um subproduto da indústria de beneficiamento de cana-de-açúcar vendido a baixo custo para complementação nutricional de ração animal ou, em alguns casos, descartado como resíduo. O melaço tem sido largamente utilizado como fonte de carbono em fermentações com leveduras para produção de álcool (LIU *et al.*, 1998), pois além de ser mais barato do que a glicose, ele contém elementos traços e vitaminas que podem ser usados como potencializadores do crescimento (BEAULIEU *et al.*, 1995). A produção de bacteriocinas por *Lactobacillus plantarum* BN também foi descrita quando na presença de melaço (MAZO *et al.*, 2002).

A produção de biopolímeros sintetizados por *Sphingomonas capsulata* ATCC 14666 tem apresentado bons resultados na presença desse subproduto, onde a melhor produção foi obtida com melaço pré-tratado a 8% (0,290 g L⁻¹ h⁻¹) (BERWANGER *et al.*, 2007). Carvão ativado preparado com bagaço de cana e pequena adição de melaço tem se apresentado tão eficiente na descoloração quanto um carvão ativado comercial (GONÇALVES *et al.*, 2006).

Diante dessa discussão, visando o aproveitamento de resíduos e subprodutos agroindustriais e a possível redução nos custos de produção de biossurfactantes, isolados bacterianos pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) do Departamento de Microbiologia (DMB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) foram selecionados com base na sua capacidade de produzir biossurfactantes a partir de substratos baseados em manipueira e melaço. A otimização da composição desse meio foi estudada para cada um dos isolados bacterianos utilizados. O biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A foi testado quanto à estabilidade de emulsões com querosene. O efeito do pH, da temperatura e da salinidade sobre a estabilidade das emulsões, sobre

a tensão superficial dos extratos e sobre a diluição micelar crítica foi também investigado.

1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A. Biosurfactant production from olive oil by *Pseudomonas fluorescens*. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, p.340-347, 2007.

ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, S.; NABI, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, v.223, p.143-151, 2008.

ARAGÃO, M. do L.; PONTE, J. J. da. O uso da manipueira - extrato líquido das raízes de mandioca - como adubo foliar. *Ciência Agrônômica*, v.26, n.1/2, 1995.

BANAT, I.M. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, v.15, n.6, p.591-594, 1993.

BANAT, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresource Technology*, v.51, p.1-12, 1995.

BANAT, I.M., MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbial Biotechnology*, v.53, p.495-508, 2000.

BARROS, F.F.C.; MANO, M.C.R.; BICAS, J.L.; DIONISIO, A.; QUADROS, C.P.; UENOJO, M.; SANTOS, R. dos; PASTORE, G.M. Optimization of the production of a *Bacillus subtilis* biosurfactant using response surface method. *Journal of Biotechnology*, v.131, n.2, s.1, p.173-174, 2007a.

BARROS, F.F.C.; MANO, M.C.R.; BICAS, J.L.; QUADROS, C.P.; DIONISIO, A.; UENOJO, M.; NERI, I.A.; PASTORE, G.M. Production and stability of *Bacillus subtilis* biosurfactants using cassava wastewater in a pilot scale. *Journal of Biotechnology*, v.131, n.2, s.1, p.172-173, 2007b.

BEAULIEU, M.; BEAULIEU, Y.; MÉLINARD, J.; PANDIAN, S.; GOULET, J. Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate. *Applied Environmental Microbiology*, v.61, n.1, p.165-169, 1995.

BERWANGER, A. L. da S.; SCAMPARINI, A. R. P.; DOMINGUES, N. M.; VANZO, L. T.; TREICHEL, H.; PADILHA, F. F. Produção de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata* a partir de meios industriais. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.31, n.1, p.177-183, 2007.

BICCA, C.F., FLECK, L.C.; AYUB, M.A.Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus rubber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.30, p.231-236, 1999.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.152, p.41-52, 1999.

BRYANT, R.S. Potential uses of microorganisms in petroleum recovery technology. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, v.67, p.97-104, 1987.

- CALVO, C.; TOLEDO, F.L.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. *Journal of Biotechnology*, v.109, p.255–262, 2004.
- CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbial Biotechnology*, v.50, p.520-529, 1998.
- CAMILI, E.A.; CABELLO, C. *Produção de etanol de manipueira tratada com processo de flotação*. Disponível em: [http://www.abam.com.br/congresso/43 Eleoneida aparecida camili\[1\].pdf](http://www.abam.com.br/congresso/43_Eleoneida_aparecida_camili[1].pdf) > Acesso em: 14 Ago. 2008).
- CHA, D.K. The effect of biosurfactants on the fate and transport of nonpolar organic contaminants in porous media. *Environmental Engineering*, v.1, p.1-17, 2000.
- COOPER, D.G.; MACDONALD, C.R.; DUFF, S.J.B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Applied and Environmental Microbiology*, v.42, n.3, p.408-412, 1981.
- COOPER, D.G.; PADDOCK, D.A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.47, n.1, p.173-176, 1984.
- DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Characterization of biochemical properties and biological activities of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid and non-mucoid strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil sample. *Applied Microbial Biotechnology*, v.69, p.192-199, 2005.
- DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.61, n.1, p.47-64, 1997.
- DUBEY, K.; JUWARKAR, A. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.17, p.61-69, 2001.
- EDWARDS, K.R.; LEPO, J.E.; LEWIS, M.A. Toxicity comparison of biosurfactant and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species. *Marine Pollution Bulletin*, v.46, p.1309-1316, 2003.
- ESPUNY, M.J.; EGIDO, S.; RODÓN, I.; MANRESA, A.; MERCADÉ, M.E. Nutritional requirements of a biosurfactant producing strain *Rhodococcus* sp. 51T7. *Biotechnology Letters*, v.18, n.5, p.521-526, 1996.
- FAO – Food and Agriculture Organization, *FAOSTAT*. Disponível em: <http://faostat.fao.org> > Acesso em: 10 Jun. 2008.
- FERNANDES Jr., A. *Tratamentos físicos e biológicos da manipueira: em manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca*; Cereda, M.P., ed.; Fundação. Cargill, São Paulo, cap. 10, 2000.
- FOX, S.L.; BALA, G.A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Bioresource Technology*, v.75, p.235-240, 2000.
- GEORGIU, G.; LIN, S.C.; SHARMA, M.M. Surface-active compounds from microorganisms. *Biotechnology*, v.10, n.1, p.60-65, 1992.

GONÇALVES, G. da C.; MENDES, E. S.; PEREIRA, N. C.; SOUSA, J. C. de. Produção de carvão ativado a partir de bagaço e melão de cana-de-açúcar. *Acta Scientiarum. Technology*, v.28, n.1, p.21-27, 2006.

GOODLEY, J. *A compendium DHI-water and environment*. 4th ed., 2004. Disponível em: <http://www.fao.org> > Acesso em: 28 Ago. 2008.

GUERRA-SANTOS, L.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.48, n.2, p.301-305, 1986.

HERMAN, D.C.; ARTIOLA, J.F.; MILLER, R.M. Removal of cadmium, lead, and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant. *Environmental Science & Technology*, v.29, p.2280-2285, 1995.

ILORI, M.O.; AMOBI, C.J.; ODOCHA, A.C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. *Chemosphere*, v.61, p.985-992, 2005.

JANG, L.K.; CHANG, P.W.; FINDLEY, J.E.; YEN, T.F. Selection of bacteria with favorable transport properties through porous rock for the application of microbially enhanced oil recovery. *Applied Environmental Microbiology*, v.46, n.5, p.1066-1072, 1983.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; JHA, S.; YADAV, S.; NERURKAR, A.; DESAI, A.J. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, v.99, p.195-199, 2008.

LEONEL, M.; CEREDA, M.P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v.52, n.2, p.299-304, 1995.

LI, Q.; KANG, C.; WANG, H.; LIU, C.; ZHANG, C. Application of microbial enhanced oil recovery technique to Daqing Oilfield. *Biochemical Engineering Journal*, v.11, p.197-199, 2002.

LIU, F.; LI, W.; RIDGWAY, D.; GU, T. Production of poly- β -hydroxybutyrate on molasses by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, v.20, n.4, p.345-348, 1998.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.74, p.887-889, 1997.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.20, p.48-52, 1998.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. *Journal of Surfactants and Detergents*, v.2, n.2, p.237-241, 1999.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Effects of various nutritional supplements on biosurfactant production by a strain of *Bacillus subtilis* at 45°C. *Journal of Surfactants and Detergents*, v.5, n.1, p.11-17, 2002a.

- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.58, p.428-434, 2002b.
- MAKKAR, R.S.; ROCKNE, K.J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.22, n.10, p.2280-2292, 2003.
- MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, v.27, n.3, p.675-683, 2005.
- MARÓSTICA, M.R.; PASTORE, G.M. Production of R-(+)- α -terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as medium. *Food Chemistry*, v.101, p.345-350, 2007.
- MAZO, J. Z.; SANTIÁNNA, E. S; FRANCO, B. D. G. M.; PORTO, A. C.; FIORENTINI, A. M. Detecção de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* BN em melão de cana-de-açúcar sob fermentação submersa. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*. v.20, n.1, p.157-172, 2002.
- McINERNEY, M.J.; DUNCAN, K.E.; YOUSSEF, N.; FINCHER, T.; MAUDGALYA, S.K.; FOLMSBEE, M.J.; KNAPP, R.; SIMPSON, R.R.; RAVI, N.; NAGLE, D. Development of microorganisms with improved transport and biosurfactant activity for enhanced oil recovery. In _____. *Microbial strains with improved transport ability through model porous systems, Final Report*, p.100-114, 2005.
- MERCADE, M.E.; MANRESA, M.A. The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.71, n.1, p.61-64, 1994.
- MOHAN, P.K.; NAKHLA, G.; YANFUL, E.K. Biodegradability of Surfactants under Aerobic, Anoxic, and Anaerobic Conditions. *Journal Environmental Engineering*, v.132, n.2, p.279-283, 2006.
- MOUSSA, T.A.A.; AHMED, G.M.; ABDEL-HAMID, S.M.S. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Nocardia amarae*. *Journal of Applied Sciences Research*, v.2, n.11, p.844-850, 2006.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. *FEMS Microbiology Ecology*, v.54, p.479-489, 2005.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. *TRENDS in Biotechnology*, v.24, n.11, p. 509-515, 2006.
- MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.55, n.11, p.3016-3019, 1989.
- MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F.; JAMES, S.; BENNETT, H.P.J. Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin. *Environmental Science & Technology*, v.33, p.3812-3820, 1999.

- NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G.M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.35, p.81-85, 2004.
- NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.; HADDAD, R.; GOLÇALVES, L.A.G.; EBERLIN, M.N.; CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. *Biotechnology Progress*, v.21, p.1562-1566, 2005.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology*, v.97, p.336-341, 2006.
- OKPOKWASILI, G.C.; IBIENE, A.A. Enhancement of recovery of residual oil using a biosurfactant slug. *African Journal of Biotechnology*, v.5, n.5, p.453-456, 2006.
- PATEL, R.M.; DESAI, A.J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Letters in Applied Microbiology*, v.25, p.91-94, 1997.
- PONTE, J. J. Histórico das pesquisas sobre a utilização da manipueira (extrato líquido das raízes de mandioca) como defensivo agrícola. *Fitopatologia Venezuelana*, Maracay, v.5, n.1, p.2-5, 1992.
- RAMNANI, P.; KUMAR, S.S.; GUPTA, R. Concomitant production and downstream processing of alkaline protease and biosurfactant from *Bacillus licheniformis* RG1: bioformulation as detergent additive. *Process Biochemistry*, v.40, p.3352-3359, 2005.
- RASHEDI, H.; ASSADI, M.M.; BONAKDARPOUR, B.; JAMSHIDI, E. Environmental importance of rhamnolipid production from molasses as a carbon source. *Environmental Science & Technology*, v.2, n.1, p.59-62, 2005.
- RISMANI, E.; FOOLADI, J.; EBRAHIMI, G.H. Biosurfactant production in bath culture by a *Bacillus licheniformis* isolated from the Persian Gulf. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v.9, n.13, p.2498-2502, 2006.
- ROCHA, M.V.P.; OLIVEIRA, A.H.S.; SOUZA, M.C.M.; GONÇALVES, R.L.B. Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v.22, p.1295-1299, 2006.
- ROCHA, M.V.P.; MENDES, J.S.; GIRO, M.E.A.; GONÇALVES, L.R.B. Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em suco de caju. *4º PDPETRO*, Campinas, SP, p.1-10, 2007.
- RODRIGUES, L.R.; TEIXEIRA, J.A.; OLIVEIRA, R. Low-cost fermentative médium for biosurfactant production by probiotic bactéria. *Biochemical Engineering Journal*, v.32, p.135-142, 2006.
- RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, v.3, n.4, p.229-236, 2001.
- ROUKAS, T. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. *Process Biochemistry*, v.3, n.8, p.805-810, 1998.

- SABATINI, D.A.; McINERNEY, M.J.; YOUSSEF, N.; NGUYEN, T. Evaluation of sub-micellar synthetic surfactants versus biosurfactants for enhanced LNAPL recovery. *Final Report*, p.1-57, 2006.
- SANDRIN, T.R.; CHECH, A.M.; MAIER, R.M. A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, n.10, p.4585-4588, 2000.
- SANTOS, A.B.C.; PONTE, J.J. da. Ação fungicida da manipueira no controle de Oídio. *Fitopatologia brasileira*, v.18, 302 p., 1993. (resumo).
- SANTOS, E.C.; JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.M.; PERALBA, M do C.R.; SELBACH, P.A.; SÁ, E.L.S.; CAMARGO, F.A.O. Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp. *Bioresource Technology*, v.99, p.2644-2649, 2008.
- SARUBBO, L.A.; FARIAS, C.B.B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Current Microbiology*, v.54, p.68-73, 2007.
- SCHIPPERS, C.; GEBNER, K.; MÜLLER, T.; SCHEPER, T. Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. *Journal of Biotechnology*, v.83, p.189-198. 2000.
- SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. *Progress in Energy and Combustion Science*, 11p, 2008.
- SEPAHY., A.A.; ASSADI, M.M.; SAGGADIAN, V.; NOOHI, A. Production of biosurfactant from Iranian oil fields by isolated Bacilli. *International Journal of Environmental Science & Technology*, v.1, n.4, p.287-293, 2005.
- SINGH, A.; VAN HAMME, J.D.; WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part2.Application aspects. *Biotechnology Advances*, v.23, p.99-121, 2007.
- TABATABAEE, A.; ASSADI, M.M.; NOOHI, A.A.; SAJADIAN, V.A. Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs. *Iranian Journal Environmental Health Science & Engineering*, v.2, n.1, p.6-12, 2002.
- WEI, Y.; WANG, L.; CHANG, J. Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress*, v.20, p.979-983, 2004.
- WEI, Y, LAI, C, CHANG, J. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Process Biochemistry*, v.42, p.40-45, 2007.
- YAKIMOV, M.M.; MOHAMMED, M.A.; BOCK, M.; BOSEKER, K.; FREDRICKSON, H.L.; KESSEL, D.G.; TIMMIS, K.N. The potential of *Bacillus licheniformis* strains for in situ enhanced oil recovery. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v.18, p.147-160, 1997.
- YOUSSEF, N.; SIMPSON, D.R.; DUNCAN, K.E.; McINERNEY, M.J.; FOLMSBEE, M.; FINCHER, T.; KNAPP, R.M. In situ biosurfactant production by *Bacillus* strains injected into a limestone petroleum reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, v.73, n.4, p.1239-1247, 2007.

ZAJIC, J.E.; GUIGNARD, H.; GERSON, D.F. Properties and biodegradation of a bioemulsifier from *Corynebacterium hydrocarboclastus*. *Biotechnology and Bioengineering*, v.19, n.9, p.1303-1320, 1977.

CAPITULO 2

SELEÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS PRODUTORES DE BIOSURFACTANTES EM MEIOS À BASE DE MELAÇO E MANIPUEIRA

RESUMO

Biossurfactantes apresentam algumas vantagens em comparação com os surfactantes sintéticos, como a baixa toxicidade, biodegradabilidade e a permanência de suas funções mesmo em condições extremas. Contudo, o alto custo de produção é um fator limitante para seu uso comercial em larga escala. A produção desses compostos a partir de substratos agroindustriais tem sido uma das vias utilizadas para superação desse problema. Neste trabalho, foi avaliada a produção de biossurfactante por três isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, seis isolados de *Bacillus* spp. e um isolado de *Dietzia maris* em meios de cultura formulados a partir de substratos baseados em manipueira e melaço. O tempo de cultivo necessário para a obtenção da maior concentração de biossurfactante no meio de crescimento foi verificado. Os isolados que se destacaram durante o experimento, cujos extratos livres de células, puros ou diluídos 20 vezes, apresentaram os menores valores de tensão superficial, foram: *P. aeruginosa* LBBMA 88A (26,8 mJ m⁻² e 39,5 mJ m⁻², respectivamente); *B. subtilis* LBBMA 155 (28,3 mJ m⁻² e 39,6 mJ m⁻²) e *B. subtilis spizizenii* LBBMA 283 (28,2 mJ m⁻² e 37,9 mJ m⁻²). O tempo testado considerado suficiente para se alcançar os menores valores de tensão e as maiores concentrações de biossurfactantes no meio de crescimento foi o de 72 horas.

Palavras-chave: Surfactante; Resíduo agro-industrial; Produto biotecnológico.

2.1 INTRODUÇÃO

Surfactantes são compostos ativos de superfície caracterizados pela capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido. Alguns tensoativos são conhecidos como biossurfactantes, surfactantes produzidos por seres vivos. O curto tempo de geração dos microrganismos, em comparação com os demais organismos, torna-os os mais promissores para a produção comercial desses compostos (DESAI e BANAT, 1997; MAKKAR e CAMEOTRA, 1998).

Biossurfactantes podem ser produzidos por uma grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias, algas microscópicas, fungos e archaeas (NAZINA *et al.*, 2003). Dentre as bactérias produtoras de biossurfactantes, incluem-se as dos gêneros *Pseudomonas* (MULLIGAN e GIBBS, 1989; PATEL e DESAI, 1997; LI *et al.*, 2002; BENINCASA *et al.*, 2004; DAS e MUKHERJEE, 2005; RASHEDI *et al.*, 2005; OKPOKWASILI e IBIENE, 2006; ROCHA *et al.*, 2007; ABOUSEOUD *et al.*, 2008), *Rhodococcus* (BICCA *et al.*, 1999; ESPUNY *et al.*, 1996), *Flavobacterium* (BODOUR *et al.*, 2004), *Bacillus* (COOPER e GOLDENBERG, 1987; BANAT, 1993; YAKIMOV *et al.*, 1995; MAKKAR e CAMEOTRA, 1998; MAKKAR e CAMEOTRA, 2002; WEI *et al.*, 2003; RAMNANI *et al.*, 2005; SEPAHY *et al.*, 2005; NITSCHKE e PASTORE, 2006; RISMANI *et al.*, 2006; WEI *et al.*, 2007; FERNANDES, 2007), *Arthrobacter* (MORIKAWA *et al.*, 1993), *Dietzia* (NAZINA *et al.*, 2003), *Nocardia* (MOUSSA *et al.*, 2006), *Serratia* (CUNHA *et al.*, 2004; BIDLAN *et al.*, 2007) e *Acinetobacter* (NADARAJAH *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2006). Essa diversidade de bactérias produtoras remete à produção de diferentes tipos de biossurfactantes, os quais são potencialmente aplicáveis em diversos produtos e processos industriais ou ambientais (ROSENBERG e RON, 1999).

As pesquisas com biossurfactantes têm sido orientadas para atender demandas advindas de indústrias, como a alimentícia, farmacêutica, petroquímica, de cosméticos e a biotecnológica. Os esforços recentes para tornar viável a aplicação de biossurfactantes em larga escala estão relacionados ao fato dos mesmos apresentarem baixa toxicidade ao ambiente (SCHIPPERS *et al.*, 2000; MAKKAR e ROCKNE, 2003; EDWARDS *et al.*, 2003), características favoráveis à biodegradabilidade (SCHIPPERS *et al.*, 2000; MAKKAR e ROCKNE, 2003) e funcionabilidade em condições extremas de pH, temperatura e salinidade (BANAT, 1993; MAKKAR e CAMEOTRA, 1998; DAS e MUKHERJEE, 2005; ILORI *et al.*, 2005; SEPAHY *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2007).

Além disso, investimentos têm sido feitos no cultivo misto de bactérias, pois misturas de biossurfactantes, aniônicos e catiônicos (BERGSTRÖM, 2001) e iônicos e não-iônicos (ZHU e FENG, 2003), exibem comportamento sinérgico quando em proporções apropriadas, como melhor solubilidade e maior eficiência.

O custo de produção de biossurfactantes é ainda um fator limitante para seu uso comercial em larga escala. O alto custo pode ser tolerado quando o biossurfactante é usado em pequenos volumes, como em cosméticos e medicamentos. Contudo, quando são necessários volumes maiores, como no caso da aplicação em recuperação avançada de petróleo melhorada por microrganismos (MEOR), o seu uso é inviabilizado por esse fator (MUKHERJEE *et al.*, 2006).

A produção em substratos miscíveis em água tem sido considerada como a forma mais promissora em termos de custo de produção. Há uma grande variedade de substratos miscíveis, cuja utilização pode reduzir o custo de produção, como a água residuária rica em amido de batata (FOX e BALA, 2000; RAMNANI *et al.*, 2005) ou de mandioca (NITSCHKE *et al.*, 2004; NITSCHKE e PASTORE, 2006), gordura animal (DESHPANDE e DANIELS, 1995), soro de leite (DUBEY e JUWARKAR, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2006), ou ainda subprodutos da fabricação do álcool (DUBEY e JUWARKAR, 2001) e do açúcar (GHURYE e VIPULANANDAN, 1994; PATEL e DESAI, 1997; ROUKAS, 1998; NITSCHKE *et al.*, 2004; RASHEDI *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2006).

Desta forma, visando a utilização de resíduos e subprodutos agroindustriais e uma possível redução nos custos de produção de biossurfactantes, este trabalho teve como objetivo selecionar isolados bacterianos com maior capacidade de produção de biossurfactante, a partir de substratos baseados em manipueira e melão, considerando-se ainda a possibilidade da sua produção a partir de culturas mistas.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Isolados bacterianos

Os dez isolados bacterianos utilizados neste trabalho (Tabela 2.1) foram caracterizados como produtores de biossurfactantes (BATISTA, 2002; LIMA, 2003) e depositados na coleção de culturas de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) do Departamento de Microbiologia (DMB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Tabela 2.1. Identificação e origem dos isolados bacterianos produtores de biossurfactantes utilizados neste estudo

Isolado	Identificação	Origem
LBBMA 47	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Solo de “landfarming” – REGAP ¹
LBBMA 58	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Solo de “landfarming” - REGAP
LBBMA 88A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Solo de “landfarming” - REGAP
LBBMA 111A	<i>Bacillus sp</i>	Sedimento de fundo de mangue contaminado por petróleo – REDUC ²
LBBMA 155	<i>Bacillus subtilis</i>	Sedimento de fundo de mangue contaminado por petróleo – REDUC
LBBMA 191		Borra oleosa – RECAP ³
	<i>Dietzia maris</i>	
LBBMA 270	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Amostra de água de injeção de Jazida
LBBMA 271	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Amostra de água de injeção de Jazida
LBBMA 272	<i>Bacillus subtilis</i>	Amostra de água de injeção de Jazida
LBBMA 283	<i>Bacillus subtilis spizizenii</i>	Amostra de água de injeção de Jazida

¹ REGAP - Refinaria Gabriel Passos, Betim, Minas Gerais.

² REDUC - Refinaria Duque de Caxias, Duque de Caxias, Rio de Janeiro.

³ RECAP - Refinaria de Capuava, Mauá, São Paulo.

2.2.2 Meios de cultura

As culturas dos isolados bacterianos da coleção do LBBMA foram inicialmente ativadas em meio de cultura R2A (Tabela 2.2), com pH ajustado para 7,2 (REASONER e GELDREICH, 1985), antes de serem utilizadas na avaliação da produção de biossurfactantes em quatro formulações de meio de cultura, a saber: (i) Meio Mineral (MM) (BODOUR e MILLER-MAIER, 1998) acrescido de glicose (controle do

experimento) (Tabela 2.2); (ii) MM suplementado com melação; (iii) MM preparado em manipueira, em substituição a água e (iv) meio composto apenas de manipueira e melação, com relação 1:1 em massa de açúcares totais (Tabela 2.3). As fontes de carbono foram fornecidas com a mesma concentração total de açúcares, ajustada pela quantidade presente na manipueira pura (0,47%), fonte que forneceu a menor porcentagem de açúcares totais. O pH do meio foi ajustado para 6,8 seguindo-se a autoclavagem a 121°C por 15 minutos.

Tabela 2.2. Composição dos meios R2A e do meio mineral (MM)

Meio R2A ¹		Meio Mineral (MM) ²	
Componentes	Quantidades	Componentes	Quantidades
Extrato de levedura	0,50 g	NH ₄ Cl	1,000 g
Proteose peptona	0,50 g	KH ₂ PO ₄	1,500 g
Casaminoácidos	0,50 g	Na ₂ HPO ₄	4,000 g
Glicose	0,50 g	Mg SO ₄	0,200 g
Amido solúvel	0,50 g	CaCl ₂ · H ₂ O	0,013 g
Piruvato de sódio	0,30 g	Citrato de ferro III amoniacal	0,005 g
K ₂ HPO ₄	0,30 g	Glicose	4,707 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,05 g		
Água	1000,00 mL	Água	1000,00 mL

¹ Reasoner e Geldreich (1985)

² Bodour e Miller-Maier (1998)

Tabela 2.3. Composição do meio mineral suplementado com melação e/ou manipueira

MM + melação		MM + manipueira		Melação + manipueira	
Componentes	Quantidades	Componentes	Quantidades	Componentes	Quantidades
NH ₄ Cl	1,000 g	NH ₄ Cl	1,000 g	Melaço	4,25 g
KH ₂ PO ₄	1,500 g	KH ₂ PO ₄	1,500 g	Manipueira	500,00 mL
Na ₂ HPO ₄	4,000 g	Na ₂ HPO ₄	4,000 g	Água	q.s.p. 500 mL
Mg SO ₄	0,200 g	Mg SO ₄	0,200 g		
CaCl ₂ · H ₂ O	0,013 g	CaCl ₂ · H ₂ O	0,013 g		
Citrato de ferro III amoniacal	0,005 g	Citrato de ferro III amoniacal	0,005 g		
Melaço	8,5 g				
Água	1000,00 mL	Manipueira	1000,00 mL		

O melação foi obtido na Companhia Agrícola Pontenovense – Usina Jatiboca, em Ponte Nova, Minas Gerais e armazenado em câmara fria a $\leq 8^{\circ}\text{C}$ até o momento da sua utilização, antes da qual passou por um processo de pré-tratamento visando à retirada de sólidos insolúveis. Este processo consistiu no ajuste do pH do melação para 3,0 com solução de H₂SO₄ a 2 mol L⁻¹, seguindo-se repouso por 24 horas em temperatura ambiente e centrifugação a 5.000 g (Sorvall® - RT6000B, Kendro Laboratory Products, Asheville, NC) por 15 minutos. O pH do sobrenadante foi ajustado para 6,8 com

solução de NaOH a 2 mol L^{-1} (ROUKAS, 1998), antes da autoclavagem a 121°C , por 15 minutos.

A manipueira foi obtida em área de produção artesanal de polvilho de mandioca, na zona rural de Viçosa, Minas Gerais. O líquido de aspecto leitoso, resíduo da prensagem da mandioca, foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e armazenado nas mesmas condições descritas para o melaço até o momento da sua utilização, antes da qual também passou por um processo de pré-tratamento. A manipueira foi aquecida até a fervura, resfriada à temperatura ambiente e centrifugada a 9.400 g (Sorvall[®] - RT6000B, Kendro Laboratory Products, Asheville, NC) por 20 minutos, para a remoção do amido e de outros sólidos insolúveis (NITSCHKE *et al.*, 2004). O sobrenadante formado a partir desse processo, após autoclavagem a 121°C por 15 minutos, consistiu na manipueira tratada que foi utilizada neste estudo.

Análises químicas e bioquímicas foram efetuadas no melaço e na manipueira tratados e compreenderam a medição da condutividade elétrica (CE) e do potencial hidrogeniônico (pH), além da quantificação das concentrações de DBO, pelo método iodométrico; DQO, pelo método do refluxo aberto; sódio (Na) e potássio (K), por fotometria de chama; fósforo (P), por espectrofotometria; cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe) e manganês (Mn), por espectrofotometria de absorção atômica; sólidos totais (ST), sólidos em suspensão totais (SST), sólidos dissolvidos totais (SDT) e sólidos voláteis (SV), pelo método gravimétrico (APHA, AWWA & WEF, 1998). Determinou-se nitrogênio total (N) pelo método semimicro Kjeldahl com adição de ácido salicílico, adaptado de Kiehl (1995) e nitrogênio na forma de nitrato pelo método de Yang *et al.* (1998).

Além disso, no melaço os açúcares totais e os açúcares redutores foram determinados pelo método de Fehling (GOMES, 1996), enquanto na manipueira os açúcares totais foram determinados pelo método fenol-sulfúrico (DANIELS *et al.*, 1994) e os redutores pelo método colorimétrico DNS (MILLER, 1959).

Tabela 2.4. Características físico-químicas da manipueira e do melão após o pré-tratamento para retirada de sólidos insolúveis

Variáveis	Concentração (mg L ⁻¹)	
	Manipueira	Melão
pH	4,56	3,75
Condutividade elétrica (CE)	1.072	10.360
DQO	5.760	91.200
DBO	1.933	7.825
Sólidos totais (ST)	4.502	78.806
Sólidos voláteis (SV)	3.874	68.466
Sólidos em suspensão totais (SST)	72	432
Sólidos dissolvidos totais (SDT)	4.430	78.374
Açúcares totais	4.707	55.560
Açúcares redutores	3.5	16.100
Açúcares não-redutores	4.703	39.460
Nitrogênio total (N _T)	210	628
N-Nitrato	4,5	415
Fósforo (P)	643	46,4
Potássio (K)	49	3.833
Sódio (Na)	3,3	10,1
Cálcio (Ca)	3,52	967
Magnésio (Mg)	8,12	322
Ferro (Fe)	N.D.	18,5
Manganês (Mn)	0,155	4,22

N.D. – Não detectável pelo equipamento de leitura ou pela técnica de determinação.

2.2.3 Preparo do inóculo e condições de cultivo

O inóculo foi preparado a partir da adaptação das culturas aos diferentes meios estudados. A adaptação consistiu na transferência de uma alíquota da cultura previamente ativada em meio R2A, após centrifugação a 12.000 g (Jouan[®] MR-23i) por 15 minutos e ressuspensão em solução salina a 0,85%, para frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 15 mL dos meios de crescimento, por duas vezes consecutivas. O inóculo assim obtido foi transferido para frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL dos meios de crescimento, de modo a se obter uma densidade óptica inicial a 600 nm equivalente a 0,100 em (BIO-RAD SmartSpec[™] 3000). Para cada uma das adaptações, assim como para a reativação dos microrganismos em R2A, o tempo de

incubação foi de 14 horas sob temperatura de 30°C em agitador orbital à 200 rpm (New Brunswick Scientific, Edison, Nj-USA, Modelo C25KC incubator SHAKER, Classic series). As condições de cultivo para produção de biossurfactante nos diferentes meios foram as mesmas, excetuando-se o tempo de 168 horas de incubação. Medidas de tensão superficial do extrato livre de células foram realizadas a cada 24 horas. As determinações de tensão em extratos diluídos foram obtidas com 72 e 168 horas de incubação.

A atividade metabólica microbiana em relação aos substratos utilizados foi acompanhada ao longo do período de cultivo por meio da evolução de CO₂. Para essa avaliação, um volume de inóculo necessário para se obter uma densidade óptica inicial a 600 nm de 0,100 foi adicionado a frascos respirométricos contendo 10 mL de meio de cultura. Os frascos com capacidade para 125 mL (Gibco BRL, Life Technologies) foram acoplados a um respirômetro dotado de um leitor de infravermelho (Sable Systems International, NE, USA). Como controle, foi utilizado um frasco contendo o meio de cultura não-inoculado.

2.2.4 Determinação da tensão superficial dos extratos bacterianos livres de células

Leituras de tensão superficial dos extratos livres de células foram realizadas pelo método do anel de du Nouy, utilizando-se um tensiômetro Fisher Surface Tensiomat (Modelo 21, Pittsburgh, EUA). Medidas de tensão foram realizadas com o extrato puro ou após diluição de 20 vezes em água desionizada. As condições de análise foram: volume médio da amostra de 8 mL, temperatura de 22°C e pH entre 6,8 e 7,0.

2.2.5 Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento foi montado seguindo-se um delineamento experimental em parcela subdividida com 10 isolados constituindo as parcelas, dispostas em blocos casualizados com 4 repetições, e com 7 tempos constituindo as subparcelas.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F, a 5% de probabilidade, para a característica “isolado” bacteriano. Em seguida, quando necessário, o Teste de Tukey foi aplicado ao mesmo nível de significância, para se

comparar as médias dos tratamentos. Análises de regressão foram utilizadas para avaliar o fator “tempo”.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As maiores reduções nos valores de tensão superficial, para a maioria dos isolados (LBBMA 47, LBBMA 58, LBBMA 88A, LBBMA 111A, LBBMA 155 e LBBMA 283), foram obtidas no meio de cultura composto por Melaço + Manipueira. Na cultura com o LBBMA 88A ocorreu a maior redução de tensão superficial, de 56,2 mJ m^{-2} para 27,6 mJ m^{-2} (Tabela 2.5).

Os isolados LBBMA 191 e LBBMA 270 promoveram as maiores reduções de tensão em MM + Melaço, que passou de 54,8 mJm^{-2} para 45,0 e 26,7 mJm^{-2} , respectivamente. Já em MM + Manipueira destacaram-se dois isolados, LBBMA 271 que reduziu a tensão superficial de 57,3 mJm^{-2} para 29,1 mJm^{-2} e o LBBMA 272 para 28,8 mJm^{-2} (Tabela 2.5).

A formulação Melaço + Manipueira foi a em que o maior número de isolados – nove em um total de dez – promoveram redução da tensão superficial para valores abaixo de 40 mN/m (Tabela 2.5), sendo este o valor mínimo para o biossurfactante ser considerado eficiente (COOPER *et al.*, 1989). Esses resultados podem ser atribuídos à presença de minerais nos substratos naturais testados, em proporções adequadas à produção de biossurfactantes. Nitrogênio e manganês, por exemplo, considerados fatores importantes na produção de biossurfactantes por vários microrganismos, estão presentes tanto no melaço quanto na manipueira. A observada ausência de fase lag em culturas supridas com melaço, em comparação com o meio mineral com glicose, é indício de que vitaminas e outros compostos orgânicos presentes nesse resíduo podem favorecer o crescimento microbiano e, conseqüentemente, a produção de metabólitos de interesse (OLIVEIRA, 2004).

O MM + glicose propiciou a produção de biossurfactante em concentração suficiente para reduzir a tensão superficial para valores abaixo de 40 mJm^{-2} por sete dos dez isolados, embora a redução de tensão por esses isolados não tenha superado a de nenhuma dos demais meios (Tabela 2.5). Valores de tensão superficial mais altos dos que os obtidos com LBBMA 58, LBBMA 88A e LBBMA 155 foram obtidos em MM + Glicose (2%), bem como menores para outros dois isolados, LBBMA 47 ($38,8 \pm 5,66 \text{ mJm}^{-2}$) e LBBMA 111A ($33,3 \pm 4,81 \text{ mJm}^{-2}$) (BATISTA, 2002), porém, nesse trabalho os valores para LBBMA 111A não superaram os alcançados em MM + Melaço ou Melaço + Manipueira (Tabela 2.5). Os resultados descritos para os isolados LBBMA

111A e LBBMA 155 (BATISTA, 2002) foram confirmados em outro trabalho (FERNANDES, 2007).

Em síntese, os dados na Tabela 2.5 confirmam a característica dos isolados de produzir biossurfactantes, sendo a formulação com Melaço + Manipueira uma alternativa que pode se mostrar com custo viável em processo de produção de biossurfactante, já que sua composição suporta o crescimento microbiano e permite a produção de biossurfactantes. Além disso, é possível observar que os isolados do gênero *Bacillus*, de uma forma geral, são mais robustos quando comparados aos demais gêneros avaliados, produzindo biossurfactantes considerados eficientes em todas as formulações testadas. Essa característica potencializa esse gênero em processos industriais, já que possibilita a substituição dos resíduos agroindustriais utilizados, por exemplo nos períodos entressafras, sem que isso cause prejuízos à produção dos biossurfactantes.

Tabela 2.5. Tensão superficial dos extratos bacterianos livres de células obtidos após cultivo por 168 horas a 30°C e 200 rpm em diferentes formulações de meio de cultura. Os valores representam leitura de tensão superficial em mJ m^{-2}

Isolados	MM+Manipueira		MM+Melaço	
	MM+Glicose			Melaço+Manipueira
TS N.I. *	54,1	57,3 48,8	54,8 51,2	56,2
LBBMA 47	48,5			40,1
LBBMA 58	37,9	45,6	51,9	28,2
LBBMA 88A	30,7	34,3	38,6	27,6
LBBMA 111A	49,9	56,4	28,4	29,6
LBBMA 155	28,0	29,3	27,0	27,9
LBBMA 191	53,3	52,5	45,0	54,2
LBBMA 270	29,0	29,4	26,7	28,2
LBBMA 271	29,2	29,1	26,9	28,7
LBBMA 272	28,7	28,8	27,3	29,3
LBBMA 283	29,3	29,3	27,2	28,2

* - Tensão superficial dos meios não inoculados.

O desempenho do isolado LBBMA 191 em todos os meios de cultura avaliados (Tabela 2.5) ficou aquém da redução mínima de tensão superficial exigida para ser considerado um biossurfactante eficiente, contudo, este foi mantido em outras etapas do estudo em razão dos resultados promissores descritos por Lima (2003), quando o mesmo foi cultivado em meios contendo fontes de carbono hidrofóbicas (borra oleosa, dodecano e hexadecano).

O meio considerado o mais promissor, Melaço + Manipueira, foi intensamente metabolizado pelos isolados em estudo. Essa atividade foi verificada por meio da evolução de CO₂ (Figura 2.1).

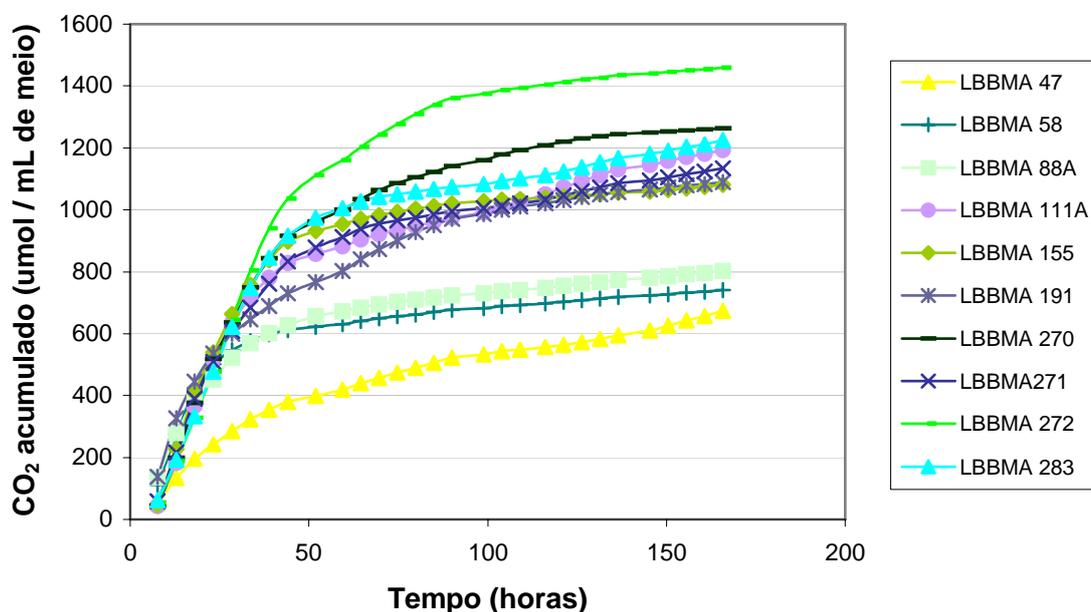


FIGURA 2.1 – Evolução de CO₂ dos isolados bacterianos LBBMA 47, LBBMA 58, LBBMA 88A, LBBMA 111A, LBBMA 155, LBBMA 191, LBBMA 270, LBBMA 271, LBBMA 272, LBBMA 283. Os isolados foram cultivados por 168 horas a 30°C em meio composto por melaço e manipueira. Os valores representam a média de quatro repetições.

A análise de variância (ANOVA) dos dados de tensão superficial dos extratos puro (Tabela 2.6) mostra que houve efeito ($p < 0,0001$) tanto dos isolados quanto do tempo de incubação na produção de biossurfactantes no meio Melaço + Manipueira como também da interação ($p = 0,0253$) tempo x isolado. A comparação das médias de tensão superficial entre os isolados bacterianos, em cada tempo de cultivo avaliado, demonstrou que, à exceção do LBBMA 47 e LBBMA 191 em que os valores foram maiores em todos os tempos de cultivo, todos os isolados apresentaram valores de tensão menores que 31 mJ m^{-2} , e que estes não diferiram entre si (Tabela 2.7).

Tabela 2.6. Análise de variância para a tensão superficial do extrato livre de células em função dos fatores “isolado” e “tempo”. Os isolados foram cultivados por 168 horas a 30°C e 200 rpm em meio composto por manipueira e melão

Fontes de variação	GL	QM	F	Sig.
BLOCO	3	98,38387	2,87	0,0379
ISOLADO	9	1338,719	39,05	< 0,0001
ERRO (A)	27	34,28653		
TEMPO	6	24,76997	4,83	0,0001
TEMPO x ISOLADO	54	7,703415	1,50	0,0253
RESÍDUO	180	5,571534		
TOTAL	279			

Coef. de Variação = 7,1525 Média Geral = 31,658

Tabela 2.7. Tensão superficial dos extratos bacterianos livres de células, em diferentes tempos de cultivo. Os isolados foram cultivados por 168 horas a 30°C e 200 rpm em meio composto por manipueira e melão. Os valores representam a média de quatro repetições

Isolados	Tempo (horas)						
	24	48	72	96	120	144	168
	----- mJ m ⁻² -----						
LBBMA 47	46,6 a	41,5 b	43,0 a	40,9 b	40,6 a	39,2 a	41,3 a
LBBMA 58	28,7 b	28,6 c	28,4 b	28,4 c	28,5 b	28,2 b	28,0 b
LBBMA 88A	27,1 b	27,0 c	26,8 b	27,1 c	27,1 b	27,1 b	26,9 b
LBBMA 111A	30,8 b	30,2 c	29,9 b	30,2 c	30,0 b	29,9 b	29,7 b
LBBMA 155	29,3 b	28,9 c	28,3 b	28,3 c	28,4 b	28,0 b	28,3 b
LBBMA 191	50,4 a	53,2 a	47,9 a	48,7 a	44,3 a	42,4 a	42,8 a
LBBMA 270	29,5 b	28,9 c	28,8 b	28,7 c	28,5 b	28,5 b	28,1 b
LBBMA 271	29,5 b	28,6 c	28,7 b	28,6 c	28,6 b	27,8 b	28,0 b
LBBMA 272	28,4 b	27,9 c	28,5 b	28,0 c	28,1 b	27,6 b	26,9 b
LBBMA 283	28,8 b	28,1 c	28,2 b	28,0 c	28,6 b	28,2 b	28,0 b

Nota: Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade, de acordo com o Teste de Tukey.

A tensão superficial durante o tempo de crescimento do isolado LBBMA 191 foi explicada de maneira significativa por um modelo de regressão linear ($p < 0,0001$) (Figura 2.1). Todos os demais isolados estudados apresentaram “tempo” como um fator não-significativo, ou seja, a tensão superficial não variou com o tempo. Com isso, infere-se que não há diferença entre estes isolados, os valores de tensão não diferem em função do tempo, à exceção do LBBMA 191.

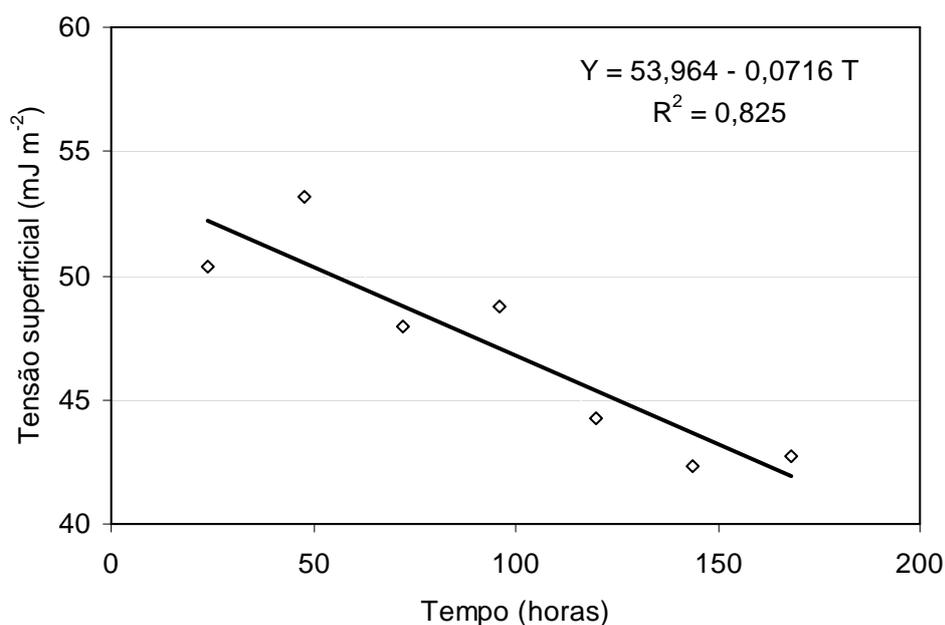


Figura 2.2 - Modelo de regressão para a tensão superficial do extrato livre de células do isolado LBBMA 191 em função do tempo. O isolado foi cultivado por 168 horas a 30°C e 200 rpm em meio composto por manipueira e melão. As medidas de tensão superficial foram obtidas a cada 24 horas. O modelo foi plotado com médias de quatro repetições.

O resultado da ANOVA realizada para o estudo da tensão superficial dos extratos livres de células diluídos 20 vezes (Tabela 2.8) mostra que o efeito da interação isolado x tempo não foi significativo ($p = 0,0605$). Logo, o estudo dos efeitos dos fatores tempo e isolado foi feito de forma independente. Para o fator tempo, tendo este sido não-significativo ($p = 0,1614$) e estudado em apenas dois níveis, a ANOVA é conclusiva, indicando que não existe diferença estatística entre os tempos de 72 e 168 horas.

Tabela 2.8. Análise de variância para a tensão superficial dos extratos livres de células diluídos 20 vezes. Os isolados foram cultivados por 168 horas a 30°C e 200 rpm em meio composto por manipueira e melão. As medidas de tensão superficial foram obtidas 72 e 168 horas após o início da incubação

Fontes de variação	GL	QM	F	Sig.
BLOCO	3	115,4002	8,38	0,0003
ISOLADO	9	499,2068	36,24	< 0,0001
ERRO (A)	27	13,77414		
TEMPO	1	8,269149	2,06	0,1614
TEMPO x ISOLADO	9	8,468303	2,11	0,0605
RESÍDUO	30	4,010121		
TOTAL	79			

Coefficiente de Variação = 4,5473

Média Geral = 44,038

A tensão superficial dos extratos livres de células na diluição de 1:20 foi influenciada significativamente pelo fator “isolado” ($p < 0,0001$). As maiores médias foram novamente apresentadas pelos isolados LBBMA 47 ($56,8 \text{ mJ m}^{-2}$) e LBBMA 191 ($59,1 \text{ mJ m}^{-2}$) (Tabela 2.9). Todos os demais isolados apresentaram valores de tensão superficial dos extratos diluídos 1:20 estatisticamente iguais, não se observando, para nenhum deles, efeito significativo do fator tempo sobre os valores de tensão encontrados.

Tabela 2.9. Tensão superficial dos extratos bacterianos livres de células diluídos 20 vezes. Os isolados foram cultivados por 168 horas a 30°C e 200 rpm em meio composto por manipueira e melão. As medidas de tensão superficial foram obtidas 72 e 168 horas após o início da incubação. Os valores representam a média de quatro repetições

Isolados	Tensão superficial (mJ m^{-2})
LBBMA 191	59,1 a
LBBMA 47	58,6 a
LBBMA 58	42,4 b
LBBMA 272	41,5 b
LBBMA 111A	41,2 b
LBBMA 270	41,0 b
LBBMA 271	39,6 b
LBBMA 155	39,6 b
LBBMA 88A	39,5 b
LBBMA 283	37,9 b

Nota: Médias seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, de acordo com o Teste de Tukey.

Com base nos resultados obtidos, adotou-se o tempo de 72 horas como sendo suficiente para se atingir a máxima produção de biossurfactantes pelos isolados estudados, com exceção do isolado LBBMA 191, cuja tensão superficial do extrato livre de células puro mostrou ser influenciada pelo tempo de incubação. Estudos com menores tempos para a variável tensão superficial do extrato diluído podem ser realizados, visando diminuir ainda mais o tempo de incubação necessário para a produção de biossurfactante por esses isolados.

Tanto as análises estatísticas realizadas para os dados de tensão superficial do extrato livre de células puro, quanto para este diluído mostraram que não houve diferença estatística entre as leituras de tensão superficial para os isolados testados, com exceção dos isolados LBBMA 47 e LBBMA 191, tornando apropriada a escolha de qualquer um dos oito isolados restantes.

A escolha dos isolados promissores na produção de biossurfactante foi então baseada, simplesmente, nos menores valores de médias de tensão superficial do extrato livre de células puro, no tempo de 72 horas, e de tensão superficial deste extrato diluído. Em todas as condições avaliadas, os isolados de destaque foram: *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A; *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 283, permitindo a presença de diferentes gêneros.

Esses isolados tiveram o crescimento, a produção e as características dos biossurfactantes por eles produzidos descritas em outros trabalhos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa ligado ao LBBMA. Os isolados LBBMA 88A e LBBMA 155, quando crescidos em fonte de carbono hidrofóbicas (borra oleosa, dodecano e hexadecano), promovem uma redução acentuada da tensão superficial e os sobrenadantes dos meios de cultura formam emulsões estáveis com querosene (LIMA, 2003). Lima (2008) confirmou os bons resultados obtidos para o isolado LBBMA 155 e ainda apontou o biossurfactante por ele produzido como estável a altas temperaturas e variações de pH, além de resistente à presença de até 5% de NaCl. Oliveira (2004) atestou a capacidade de crescimento dos isolados LBBMA 155 e LBBMA 283 em MM enriquecido com melão a altas concentrações de NaCl, 5% em condição aeróbia e 8% em condição anaeróbia. O autor reporta ainda que a velocidade específica de crescimento do isolado LBBMA 155 em meio adicionado de melão foi 3 vezes maior que no meio adicionado de sacarose. Além disso, as características apresentadas por esses isolados e pelos biossurfactantes por eles produzidos têm sido apontadas como promissoras para aplicação na tecnologia MEOR.

Tanto o gênero *Bacillus* (LBBMA 155 e LBBMA 283) quanto o gênero *Pseudomonas* (LBBMA 88A) têm sido bastante explorados quanto ao seu potencial para produção de biossurfactantes e aplicação ambiental. *Bacillus* e *Pseudomonas* já foram citados na literatura (PATEL e DESAI, 1997; NITSCHKE *et al.*, 2004; NITSCHKE e PASTORE, 2006; BARROS *et al.*, 2007) como sendo capazes de produzir biossurfactantes em fontes de baixo custo, como as utilizadas neste trabalho, apenas com a ressalva de que não há relatos da produção de biossurfactante por *Pseudomonas* utilizando-se manipueira.

Biossurfactantes produzidos por diferentes espécies dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* têm mostrado boa estabilidade durante a exposição a altas temperaturas, altas salinidades e a grandes variações de pH (MAKKAR e CAMEOTRA, 1997; ABOUSEOUD *et al.*, 2007; 2008), também possuindo propriedades emulsificantes e de

redução da tensão superficial do meio (MULLIGAN e GIBBS, 2001; CALVO *et al.*, 2004; DAS e MUKHERJEE, 2005; SIFOUR *et al.*, 2007). Essas características são essenciais para aplicação no setor petrolífero, principalmente na MEOR, pois são algumas das condições encontradas em reservatórios de petróleo. Além disso, as propriedades emulsificantes e de redução da tensão superficial são desejadas para se aumentar o rendimento da extração e adiar o declínio da produção desses reservatórios. Esses biossurfactantes também são descritos como promissores na aplicação em outras tecnologias ambientais, dada a sua habilidade de remover metais pesados (HERMAN *et al.*, 1995; MULLIGAN *et al.*, 1999; MULLIGAN e GIBBS, 2001) e de facilitar a degradação de hidrocarbonetos do petróleo (DAS e MUKHERJEE, 2007).

2.4 CONCLUSÕES

O meio composto da associação de melão e manipueira demonstrou ser um substrato alternativo promissor para a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus* spp.

Os isolados *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A, *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 283 se destacaram, neste meio de cultura, como produtores de biossurfactantes.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUSEOUD, M., MAACHI, R.; AMRANE, A. Biosurfactant production from olive oil by *Pseudomonas fluorescens*. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, p.340-347, 2007.

ABOUSEOUD, M., MAACHI, R., AMRANE, A., BOUDERGUA, S.; NABI, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, v.223, p.143-151, 2008.

APHA [AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION]; AWWA [AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION]; WEF [WATER ENVIRONMENT FEDERATION]. *Standart methods for the examination of water and wastewater*. 20th. Ed. Washington. D.C.: APHA/AWWA/WEF, 1998, [s.n.].

BANAT, I.M.. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, v.15, n.6, p.591-594, 1993.

BARROS, F.F.C.; MANO, M.C.R.; BICAS, J.L.; DIONISIO, A.; QUADROS, C.P.; UENOJO, M.; SANTOS, R.dos; PASTORE, G.M. Optimization of the production of a *Bacillus subtilis* biosurfactant using response surface method. *Journal of Biotechnology*, v.131, n.2, s.1, p.173-174, 2007.

BATISTA, S.B. *Bactérias de ambientes contaminados com petróleo ou derivados produtores de biosurfactantes e emulsificantes*. 2002. 32f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2002.

BENINCASA, M., ABALOS, A., OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.85, p.1-8, 2004.

BERGSTRÖM, M. Synergistic effects in mixtures of an anionic and a cationic surfactan. *Langmuir*, v.17, p.993-998, 2001.

BICCA, F.C., FLECK, L.C. & AYUB, M.A.Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Revista de Microbiologia*, v.30, p.231-236, 1999.

BIDLAN, R., DEEOTHI, N., RASTOGI, N.K.; MANONMANI, H.K. Optimides production of biosurfactant by *Serratia marcescens* DT-1P. *Research Journal of Microbiology*, v.2, n.10, p.705-716, 2007.

BODOUR, A.A., GUERRERO-BARAJAS, C., JIORLE, B.V., MALCOMSON, M.E., PAULL, A.K., SOMOGYI, A., TRINH, L.N., BATES, R.B.; MAIER, R.M. Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by *Flavobacterium* sp. strain MTN11. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, p.114-120, 2004.

BODOUR, A.A., MILLER-MAIER, R.M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, v.32, p.273-280, 1998.

- CALVO, C., TOLEDO, F.L.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. *Journal of Biotechnology*, v.109, p.255-262, 2004.
- COOPER, D.G.; ZAJIC, J.E.; GERSON, D.F. Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.37, n.1, p.4-10, 1979.
- COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, v.53, n.2, p.224-229, 1987.
- CUNHA, C.D., ROSÁRIO, M., ROSADO, A.S.; LEITE, S.G.F. *Serratia* sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. *Process Biochemistry*, v.39, p.2277-2282, 2004.
- DANIELS, L., HANSON, R., PHYLLIPS, J.A. *Chemical analysis*. In: Methods for General and Molecular Bacteriology. GERHARDT, P., MURRAY, R.G.E., WOOD, W.A. KRIEG, N.R. eds., American Society for Microbiology, Washington DC., p.518-519, 1994.
- DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Characterization of biochemical properties and biological activities of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid and non-mucoid strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil sample. *Applied Microbial Biotechnology*, v.69, p.192-199, 2005.
- DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, v.98, p.1339-1345, 2007.
- DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potencial. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, v.61, p.47-64, 1997.
- DESHPANDE, M.; DANIELS, L. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. *Bioresource Technology*, v.54, p.143-150, 1995.
- DUBEY, K.; JUWARKAR, A. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.17, p.61-69, 2001.
- EDWARDS, K.R., LEPO, J.E.; LEWIS, M.A. Toxicity comparison of biosurfactant and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species. *Marine Pollution Bulletin*, v.46, p.1309-1316, 2003.
- ESPUNY, M.J., EGIDO, S., RODÓN, I., MANRESA, A.; MERCADÉ, M.E. Nutritional requirements of a biosurfactant producing strain *Rhodococcus* sp. 51T7. *Biotechnology Letters*, v.18, n.5, p.521-526, 1996.
- FERNANDES, P.L. *Produção de biossurfactantes por Bacillus spp. em condições anaeróbia*. 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.
- FOX, S.L.; BALA, G.A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Bioresource Technology*, v.75, p.235-240, 2000.

GHURYE, G.L.; VIPULANANDAN, C. A practical approach to biosurfactant production using nonaseptic fermentation of mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, v.44, p.661-666, 1994.

GOMES, J.C. *Análises de alimentos*. Departamento de Tecnologia de alimentos/FUNARBE, Viçosa, UFV, 1996.

HERMAN, D.C., ARTIOLA, J.F.; MILLER, R.M. Removal of cadmium, lead, and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant. *Environmental Science & Technology*, v.29, p.2280-2280, 1995.

ILORI, M.O., AMOBI, C.J.; ODOCHA, A.C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. *Chemosphere*, v.61, p.985-992, 2005.

KIEHL, E.J. *Fertilizantes orgânicos*. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres Ltda., 1985. 492p.

LI, Q., KANG, C., WANG, H., LIU, C.; ZHANG, C. Application of microbial enhanced oil recovery technique to Daqing Oilfield. *Biochemical Engineering Journal*, v.11, p.197-199, 2002.

LIMA, T.M.S. *Produção de biossurfactantes visando o tratamento de borra oleosa*. 2003. 69f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

LIMA, T.M.S. *Determinação estrutural, toxicidade, biodegradabilidade e eficácia de biossurfactantes na remoção de fenantreno e cádmio do solo*. 2008. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.18, p.37-42, 1997.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.20, p.48-52, 1998.

MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S. Effects of various nutritional supplements on biosurfactant production by a strain of *Bacillus subtilis* at 45°C. *Journal of Surfactants and Detergents*, v.5, n.1, p.11-17, 2002.

MAKKAR, R.S.; ROCKNE, K.J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.22, n.10, p.2280-2292, 2003.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, v.31, p.426-428, 1959.

MORIKAWA, M., DAIDO, H., TAKAO, T., MURATA, S., SHIMONISHI, Y.; IMANAKA, T. New lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *Journal of Bacteriology*, v.175, n.20, p.6459-6466, 1993.

MOUSSA, T.A.A., AHMED, G.M.; ABDEL-HAMID, S.M.S. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Nocardia amarae*. *Journal of Applied Sciences Research*, v.2, n.11, p.844-850, 2006.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. *TRENDS in Biotechnology*, v.24, n.11, p.509-515, 2006.

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.55, n.11, p.3016-3019, 1989.

MULLIGAN, C.N., YONG, R.N., GIBBS, B.F., JAMES, S.; BENNETT, H.P.J. Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin. *Environmental Science & Technology*, v.33, p.3812-3820, 1999.

MULLIGAN, C.N. YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. *Journal Hazardous Materials*, v.85, p.11-115, 2001.

NADARAJAH, N., SINGH, A.; WARD, O.P. Evaluation of a mixed bacterial culture for de-emulsification of water-in-petroleum oil emulsions. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.18, p.435-440, 2002.

NAZINA, T.N., SOKOLOVA, D.Sh., GRIGOR'YAN, A.A., XUE, Y.F., BELYAEV, S.S., IVANOV, M.V. Production of Oil-Releasing Compounds by Microorganisms from the Daqing Oil Field, China. *Microbiology*, v.72, n.2, p.173-178, 2003.

NITSCHKE, M., FERRAZ, C.; PASTORE, G.M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.35, p.81-85, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology*, v.97, p.336-341, 2006.

OKPOKWASILI, G.C.; IBIENE, A.A. Enhancement of recovery of residual oil using a biosurfactant slug. *African Journal of Biotechnology*, v.5, n.5, p.453-456, 2006.

OLIVEIRA, V.B.de *Bactérias para aplicação em recuperação avançada de petróleo*. 2004. 59f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

PATEL, R.M.; DESAI, A.J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Letters in Applied Microbiology*, v.25, p.91-94, 1997.

RAMNANI, P., KUMAR, S.S.; GUPTA, R. Concomitant production and downstream processing of alkaline protease and biosurfactant from *Bacillus licheniformis* RG1: bioformulation as detergent additive. *Process Biochemistry*, v.40, p.3352-3359, 2005.

RASHEDI, H., ASSADI, M.M., BONAKDARPOUR, B.; JAMSHIDI, E. Environmental importance of rhamnolipid production from molasses as a carbon source. *Environmental Science & Technology*, v.2, n.1, p.59-62, 2005.

- REASONER, D.J.; GELDREICH, E.E. A new medium for enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, v.49, n.1, p.1-7, 1985.
- RISMANI, E., FOOLADI, J.; EBRAHIMI, G.H. Biosurfactant production in bath culture by a *Bacillus licheniformis* isolated from the Persian Gulf. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v.9, n.13, p.2498-250, 2006.
- ROCHA, M.V.P., OLIVEIRA, A.H.S., SOUZA, M.C.M. & GONÇALVES, R.L.B. Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v.22, p.1295-1299, 2006.
- ROCHA, M.V.P., MENDES, J.S., GIRO, M.E.A.; GONÇALVES, L.R.B. Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em suco de caju. 4º PDPETRO, p.1-10, Campinas, SP. 2007.
- RODRIGUES, L.R., TEIXEIRA, J.A.; OLIVEIRA, R. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bactéria. *Biochemical Engineering Journal*, v.32, p.135-142, 2006.
- ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.52, p.154-162, 1999.
- ROUKAS, T. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. *Process Biochemistry*, v.33, p.8, p.805-810, 1998.
- SCHPPERS, C., GEBNER, K., MÜLLER, T.; SCHEPER, T. Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. *Journal of Biotechnology*, v.83, p.189-198, 2000.
- SEPAHY., A.A., ASSADI, M.M., SAGGADIAN, V.; NOOHI, A. Production of biosurfactant from Iranian oil fields by isolated Bacilli. *International Journal of Environmental Science & Technology*, v.1, n.4, p.287-293, 2005.
- SIFOUR, M., AL-JILAWI, M. & AZIZ, G.M. Emulsification properties of biosurfactant produced from *Pseudomonas aeruginosa* RB 28. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v.10, n.8, p.1331-1335, 2007.
- WEI, Y.; WANG, L.; CHANG, J.; KUNG, S. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 96, n.2, p.174-178, 2003.
- WEI, Y., LAI, C.; CHANG, J. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Process Biochemistry*, v.42, p.40-45, 2007.
- YANG, J.E.; SKOGLEY, E.O.; SCHASS, P.E.; KIM, J.J. A simple spectrophotometric determination of nitrate in water, resin and extracts. *Soil Science Society of America Journal*, v.62, p.1108-1115, 1998.
- YAKIMOV, M.M., TIMMIS, K.N., WRAY, V.; FREDRICKSON, H.L. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and

halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Applied Environmental Microbiology*, v.61, n.5, p.1706-1713, 1995.

ZHU, L.; FENG, S. Synergistic solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons by mixed anionic-nonionic surfactants. *Chemosphere*, v.53, p.459-467, 2003.

CAPITULO 3

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR ISOLADOS BACTERIANOS E CULTURAS MISTAS

RESUMO

Espécies dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* destacam-se na produção de biossurfactantes tanto pelo número de pesquisas realizadas quanto pelos resultados encontrados. Investimentos têm sido feitos no cultivo misto de bactérias, já que misturas de biossurfactantes podem exibir comportamento sinérgico, quando em proporções apropriadas, como melhor solubilidade e maior eficiência. Apesar das vantagens dos biossurfactantes em relação aos surfactantes sintéticos para aplicações tanto industriais quanto ambientais, o alto custo de sua produção é ainda fator limitante para sua utilização em larga escala. Uma das formas que têm sido buscadas para se reduzir os custos de produção de biossurfactantes é a utilização de substratos alternativos. Neste trabalho, meios de cultura foram formulados a partir de melaço e manipueira e otimizados para a produção de biossurfactantes pelos isolados bacterianos *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A, *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 283, em culturas puras ou mistas. A produção de biossurfactante pelo isolado LBBMA 88A e pela cultura composta dos três isolados foi influenciada apenas pela concentração de melaço no meio de cultura. A produção de biossurfactante por LBBMA 155, por LBBMA 283, pela cultura mista LBBMA 88A + LBBMA 283 e pela cultura mista LBBMA 155 + LBBMA 283 foi influenciada tanto pela concentração de melaço quanto de nitrogênio e/ou ferro. Melaço e manipueira se mostraram bons substratos para a produção de biossurfactantes pelos isolados testados e pelas culturas mistas formadas. A utilização desses resíduos pode diminuir os custos de produção de biossurfactantes para níveis competitivos em relação aos similares químicos, viabilizando seu uso em escala comercial e ainda permitir um aproveitamento ambientalmente correto para esses compostos.

Palavras-chave: Surfactante; Manipueira; Melaço; *Pseudomonas*; *Bacillus*; DCCR.

3.1 INTRODUÇÃO

Diversos microrganismos são relatados como produtores de biossurfactantes, sendo as bactérias o grupo mais estudado. Espécies dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* merecem destaque pela quantidade de pesquisas realizadas e pelos resultados encontrados. O gênero *Bacillus* é descrito na literatura pela sua aplicabilidade na recuperação avançada do petróleo melhorada por microrganismos (MEOR) (BANAT, 1993; TABATABAEE *et al.*, 2002; SEPAHY *et al.*, 2005). Isso se deve, entre outros fatores, à sua habilidade em produzir endósporos (McINERNEY *et al.*, 2005), que são transportados mais efetivamente através dos poros da rocha-reservatório do que células vegetativas, em decorrência de sua reduzida dimensão (JANG *et al.*, 1983). Além disso, bactérias desse gênero produzem biossurfactantes anaerobicamente sob condições de alta salinidade e temperatura (YAKIMOV *et al.*, 1997). *Pseudomonas* é também uma bactéria com potencial para aplicação em MEOR, e em outros setores da cadeia do petróleo, dadas as propriedades ativas de superfície e a estabilidade das emulsões obtidas com os biossurfactantes produzidos por espécies desse gênero (LI *et al.*, 2002; DAS e MUKHERJEE, 2005; OKPOKWASILI e IBIENE, 2006).

A estratégia de realizar o cultivo misto de bactérias produtoras de biossurfactantes oferece oportunidade para o desenvolvimento de processos economicamente viáveis, uma vez que culturas puras de bactérias requerem o uso de fermentadores e meios de cultura estéreis, o que requer maior investimento de capital e os custos operacionais são mais altos (NADARAJAH *et al.*, 2002). Esses autores observaram ainda que a cultura mista estudada, composta por espécies de *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Sphingobacterium* e *Kingella*, exibiu maior atividade de-emulsificante quando comparada à cultura pura mais efetiva. Além disso, misturas de biossurfactantes aniônicos e catiônicos (BERGSTRÖM, 2001) e iônicos e não-iônicos (ZHU e FENG, 2003) exibem comportamento sinérgico, como melhor solubilidade e maior eficiência, quando em proporções apropriadas.

Biossurfactantes são mais efetivos e eficientes do que os surfactantes convencionais, pois produzem menores tensões superficiais em menores concentrações (COOPER e PADDOCK, 1984). Os biossurfactantes possuem características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os tornam comparáveis, ou até mesmo superiores, aos surfactantes sintéticos em termos de efetividade e eficiência (REISER *et al.*, 1998). Além disso, a estrutura química e as propriedades físicas dos biossurfactantes podem ser

modificadas através de manipulações genéticas, biológicas ou químicas, abrindo-se com isso desenvolvimento de novos produtos para atender a necessidades específicas (MULLIGAN e GIBBS, 1989; MUKHERJEE *et al.*, 2006).

As características dos biossurfactantes, como o tipo produzido, a quantidade e a qualidade do mesmo, são influenciadas, entre outras coisas, pela natureza da fonte de carbono e pelas concentrações dos nutrientes nitrogênio (N), fósforo (P), magnésio (Mg), ferro (Fe) e manganês (Mn) no meio de cultura (ESPUNY *et al.*, 1996; MAKKAR e CAMEOTRA, 1998; 2002; WEI *et al.*, 2003; ILORI *et al.*, 2005; RISMANI *et al.*, 2006; WEI *et al.*, 2007; ABOUSEOUD *et al.*, 2008). O emprego de substratos alternativos, como água residuária rica em amido de mandioca (manipueira) (NITSCHKE *et al.*, 2004; NITSCHKE e PASTORE, 2006) e subprodutos da fabricação do açúcar, como o melaço (GHURYE e VIPULANANDAN, 1994; PATEL e DESAI, 1997; ROUKAS, 1998; NITSCHKE *et al.*, 2004; RASHEDI *et al.*, 2005, RODRIGUES *et al.*, 2006), têm sido alternativas exploradas para se diminuir o custo de produção. Tanto melaço quanto manipueira são substratos que apresentam em sua composição açúcares e sais minerais, componentes essenciais para o crescimento microbiano e para a produção de biossurfactantes.

O objetivo deste trabalho foi otimizar a composição do meio de cultura para a produção de biossurfactantes pelos isolados *P.aeruginosa* LBBMA 88A, *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis spizizenii* LBBMA 283 a partir de substratos baseados em manipueira e melaço. O estudo foi conduzido com os três isolados bacterianos em culturas puras ou mistas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Isolados bacterianos e composição das culturas mistas

Três isolados bacterianos previamente selecionados como produtores de biossurfactantes foram utilizados para o estudo de otimização dos meios de cultura (Tabela 3.1). Os isolados pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) do Departamento de Microbiologia (DMB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Além desses isolados, e a partir deles, quatro culturas mistas foram estudadas. As culturas consistiram do agrupamento dos 3 isolados e destes 2 a 2, como mostrado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Isolados bacterianos utilizados no estudo de otimização do meio de cultura para produção de biossurfactante e composição das culturas mistas obtidas a partir do agrupamento dos isolados

Isolados / Culturas mistas	Identificação	Origem
LBBMA 88A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Solo de “landfarming” – REGAP ¹
LBBMA 155	<i>Bacillus subtili.</i>	Sedimento de fundo de mangue contaminado por petróleo – REDUC ²
LBBMA 283	<i>Bacillus subtilis spizizenii</i>	Amostra de água de injeção de Jazida
CM 1	LBBMA 88A + LBBMA 155	-
CM 2	LBBMA 88A + LBBMA 283	-
CM 3	LBBMA 155 + LBBMA 283	-
CM 4	LBBMA 88A + LBBMA 155 + LBBMA 283	-

REGAP¹ – Refinaria Gabriel Passos, Betim, Minas Gerais.

REDUC² – Refinaria Duque de Caxias, Duque de Caxias, Rio de Janeiro.

3.2.2 Meios de cultura

As culturas dos isolados bacterianos da coleção do LBBMA foram inicialmente ativadas em meio de cultura R2A contendo (g L⁻¹): extrato de levedura, 0,5; peptona proteose, 0,5; casoaminoácidos, 0,5; glicose, 0,5; amido solúvel, 0,5; Piruvato de sódio, 0,3; K₂HPO₄, 0,3; MgSO₄.7H₂O, 0,05, com pH ajustado para 7,2 (REASONER e GELDREICH, 1985).

O meio usado para produção de biossurfactantes foi constituído de melão e manipueira. A quantidade de melão (p/v) acrescida ao meio correspondeu à concentração final de melão desejada (%). Este subproduto foi então transferido para uma proveta e teve seu volume completado com água destilada para a metade do volume final do meio. A manipueira foi adicionada em uma quantidade correspondente à outra metade do volume final. O pH foi ajustado para 6,8, seguindo autoclavagem a 121°C por 15 minutos.

O melão foi obtido na Companhia Agrícola Pontenovense – Usina Jatiboca, em Ponte Nova, Minas Gerais e armazenado em câmara fria a $\leq 8^{\circ}\text{C}$ até o momento da sua utilização, antes da qual passou por um processo de pré-tratamento visando à retirada de sólidos insolúveis. Este processo consistiu no ajuste do pH do melão para 3,0 com solução de H_2SO_4 a 2 mol L^{-1} , seguindo-se repouso por 24 horas em temperatura ambiente e centrifugação a 5.000 g (Sorvall® - RT6000B, Kendro Laboratory Products, Asheville, NC) por 15 minutos. O pH do sobrenadante foi ajustado para 6,8 com solução de NaOH a 2 mol L^{-1} (ROUKAS, 1998), antes da autoclavagem a 121°C, por 15 minutos.

A manipueira foi obtida em área de produção artesanal de polvilho de mandioca, na zona rural de Viçosa, Minas Gerais. O líquido de aspecto leitoso, resíduo da prensagem da mandioca, foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e armazenado nas mesmas condições descritas para o melão até o momento da sua utilização, antes da qual também passou por um processo de pré-tratamento. A manipueira foi aquecida até a fervura, resfriada à temperatura ambiente e centrifugada a 9.400 g (Sorvall® - RT6000B, Kendro Laboratory Products, Asheville, NC) por 20 minutos, para a remoção do amido e de outros sólidos insolúveis (NITSCHKE *et al.*, 2004). O sobrenadante formado a partir desse processo, após autoclavagem a 121°C por 15 minutos, consistiu na manipueira tratada que foi utilizada neste estudo.

Análises químicas e bioquímicas foram efetuadas no melão e na manipueira tratados e compreenderam a medição da condutividade elétrica (CE) e do potencial hidrogeniônico (pH), além da quantificação das concentrações de DBO, pelo método iodométrico; DQO, pelo método do refluxo aberto; sódio (Na) e potássio (K), por fotometria de chama; fósforo (P), por espectrofotometria; cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe) e manganês (Mn), por espectrofotometria de absorção atômica; sólidos totais (ST), sólidos em suspensão totais (SST), sólidos dissolvidos totais (SDT) e sólidos voláteis (SV), pelo método gravimétrico (APHA, AWWA & WEF, 1998). Determinou-

se nitrogênio total (N) pelo método semimicro Kjeldahl com adição de ácido salicílico, adaptado de Kiehl (1995) e nitrogênio na forma de nitrato pelo método de Yang *et al.* (1998).

Além disso, no melaço os açúcares totais e os açúcares redutores foram determinados pelo método de Fehling (GOMES, 1996), enquanto na manipueira os açúcares totais foram determinados pelo método fenol-sulfúrico (DANIELS *et al.*, 1994) e os redutores pelo método colorimétrico DNS (MILLER, 1959).

Tabela 3.2. Características físico-químicas da manipueira e do melaço após o pré-tratamento para retirada de sólidos insolúveis

Variáveis	Concentração (mg L ⁻¹)	
	Manipueira	Melaço
pH	4,56	3,75
Condutividade elétrica (CE)	1.072	10.360
DQO	5.760	91.200
DBO	1.933	7.825
Sólidos totais (ST)	4.502	78.806
Sólidos voláteis (SV)	3.874	68.466
Sólidos em suspensão totais (SST)	72	432
Sólidos dissolvidos totais (SDT)	4.430	78.374
Açúcares totais	4.707	55.560
Açúcares redutores	3.5	16.100
Açúcares não-redutores	4.703	39.460
Nitrogênio total (N _T)	210	628
N-Nitrato	4,5	415
Fósforo (P)	643	46,4
Potássio (K)	49	3.833
Sódio (Na)	3,3	10,1
Cálcio (Ca)	3,52	967
Magnésio (Mg)	8,12	322
Ferro (Fe)	N.D.	18,5
Manganês (Mn)	0,155	4,22

N.D. – Não-detectável pelo equipamento de leitura ou pela técnica de determinação.

3.2.3 Preparo do inóculo e condições de cultivo

O inóculo foi preparado a partir da adaptação das culturas aos diferentes meios estudados. A adaptação consistiu na transferência de uma alíquota da cultura

previamente ativada em meio R2A, após centrifugação a 12.000 g (Jouan[®] MR-23i) por 15 minutos e ressuspensão em solução salina a 0,85%, para frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 15 mL dos meios de crescimento, por duas vezes consecutivas. O inóculo assim obtido foi transferido para frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL dos meios de crescimento, de modo a se obter uma densidade óptica inicial a 600 nm equivalente a 0,100 em (BIO-RAD SmartSpec[™] 3000). Para cada uma das adaptações, assim como para a reativação dos microrganismos em R2A, o tempo de incubação foi de 14 horas sob temperatura de 30°C em agitador orbital à 200 rpm (New Brunswick Scientific, Edison, Nj-USA, Modelo C25KC incubator SHAKER, Classic series). Para cada uma das adaptações, assim como para a reativação dos microrganismos em R2A, o tempo de incubação foi de 14 horas sob temperatura de 30°C em agitador orbital à 200 rpm. As condições de cultivo durante a produção de biossurfactante foram as mesmas, excetuando-se o período de 72 horas de incubação. Após o cultivo, os meios foram centrifugados a 12.000 g (Jouan[®] MR-23i) por 15 minutos. O extrato livre de células e algumas de suas diluições foram submetidos às medidas de tensão superficial.

A atividade metabólica microbiana em relação aos substratos utilizados foi acompanhada ao longo do período de cultivo por meio da evolução de CO₂. Para essa avaliação, um volume de inóculo necessário para se obter uma densidade óptica inicial a 600 nm de 0,100 foi adicionado a frascos respirométricos contendo 10 mL de meio de cultura. Os frascos com capacidade para 125 mL (Gibco BRL, Life Technologies) foram acoplados a um respirômetro dotado de um leitor de infravermelho (Sable Systems International, NE, USA). Como controle, foi utilizado um frasco contendo o meio de cultura não-inoculado.

3.2.4 Determinação da tensão superficial dos extratos bacterianos livres de células

Leituras de tensão superficial dos extratos livre de células foram realizadas pelo método do anel de du Nouy, utilizando-se um tensiômetro Fisher Surface Tensiomat (Modelo 21, Pittsburgh, EUA). Medidas de tensão foram realizadas com o extrato puro e após diluições de 10 e 100 vezes em água desionizada. Os valores de tensão superficial nos extratos diluídos foram empregados como uma medida indireta da concentração de biossurfactante. As condições de análise foram: volume médio da amostra de 7 mL, temperatura de 22°C e pH entre 6,8 e 7,0.

3.2.5 Delineamento experimental e análises estatísticas

Para se determinar a combinação ótima dos parâmetros do estudo (fatores ou variáveis independentes), foi empregada uma técnica de otimização de processos baseada em planejamentos fatoriais estatisticamente delineados em Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). O delineamento experimental utilizado para obtenção da equação de regressão apropriada foi o Composto Central Rotacional –DCCR, que utiliza modelos de regressão múltipla para esta finalidade.

O experimento foi conduzido num delineamento fatorial 2^3 com três variáveis independentes (melaço, nitrogênio na forma de KNO_3 e ferro na forma de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$) estudadas em 5 níveis. As variáveis dependentes foram: tensão superficial do extrato livre de células puro, tensão superficial do extrato livre de células diluído 10 e 100 vezes e taxa respiratória.

Os valores máximos e mínimos de cada variável independente foram estabelecidos com base nos encontrados na literatura. Tanto as variáveis independentes quanto seus níveis codificados têm seus valores apresentados na Tabela 3.3 e a matriz do delineamento com todos os ensaios é apresentada na Tabela 3.4.

Tabela 3.3. Níveis de variação das variáveis independentes empregados no estudo de otimização de meio de cultura para produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A, *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 283

Variáveis reais	Variáveis codificadas	Níveis de variação					
		-1,68	-1	0	+1	+1,68	
Melaço (%)	M	X ₁	2	3,6216	6	8,3784	10
KNO_3 (mmol L ⁻¹)	N	X ₂	2,25	22,52	52,25	81,98	102,25
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ (mmol L ⁻¹)	Fe	X ₃	0	0,30405	0,75	1,19595	1,5

Os resultados experimentais foram avaliados por meio de análises de regressão. Os modelos foram reajustados eliminando-se os termos não significativos, isto é, os que apresentaram uma probabilidade de significância $p \geq 0,05$. A significância dos modelos foi testada pela análise de variância (ANOVA) usando o teste de distribuição F. A pressuposição de normalidade foi testada em todas as análises. Um dendrograma foi criado, a partir das variáveis dependentes estudadas, para avaliar o grau de similaridade entre os isolados/culturas mistas. A geração do modelo, o processamento dos dados e as

análises estatísticas foram elaboradas com o auxílio do programa computacional “Minitab Inc, USA, versão 14, 2004”.

Tabela 3.4. Matriz do delineamento experimental com variáveis reais e codificadas

<i>Ensaio</i>	Variáveis reais ¹					
	X ₁	X ₂	X ₃	M (%)	N (mmol L ⁻¹)*	Fe(mmol L ⁻¹)
1	-1	-1	-1	3,6216	22,52	0,30405
2	1	-1	-1	8,3784	22,52	0,30405
3	-1	1	-1	3,6216	81,98	0,30405
4	1	1	-1	8,3784	81,98	0,30405
5	-1	-1	1	3,6216	22,52	1,19595
6	1	-1	1	8,3784	22,52	1,19595
7	-1	1	1	3,6216	81,98	1,19595
8	1	1	1	8,3784	81,98	1,19595
9	-1,68	0	0	2	52,25	0,75
10	1,68	0	0	10	52,25	0,75
11	0	-1,68	0	6	2,25	0,75
12	0	1,68	0	6	102,25	0,75
13	0	0	-1,68	6	52,25	0
14	0	0	1,68	6	52,25	1,5
15	0	0	0	6	52,25	0,75
16	0	0	0	6	52,25	0,75
17	0	0	0	6	52,25	0,75
18	0	0	0	6	52,25	0,75
19	0	0	0	6	52,25	0,75
20	0	0	0	6	52,25	0,75

¹ – As variáveis reais representam as formulações dos meios de cultura: M = melão %; N = KNO₃ mmol L⁻¹ e Fe = Fe (NO₃)₃ mmol L⁻¹ codificadas como x1, x2 e x3, respectivamente.

* - Valores correspondentes a concentração proposta para a fonte de nitrogênio (KNO₃) somada a concentração de nitrogênio fornecida pela adição da fonte de ferro (Fe (NO₃)₃).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 4 equações de regressão, correspondentes às cinco variáveis-resposta, tensão superficial do extrato livre de células puro, tensão superficial do extrato livre de células diluído 10 e 100 vezes, e taxa respiratória foram utilizadas para determinação das condições ideais de produção de biossurfactantes, representadas aqui como melhor composição de meio de cultura, e suas tensões superficiais teóricas associadas (Tabela 3.5). Para se obter a estimativa das variáveis todos os fatores aleatórios que interferem na atividade dos biossurfactantes foram desconsiderados.

As variáveis estudadas para o isolado *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A enquadraram-se em modelos de regressão lineares (Figura 3.1), onde a concentração de melaço no meio de cultura foi o único fator que influenciou significativamente ($p < 0,002$) a tensão superficial dos extratos puros e diluídos e a taxa respiratória desse isolado. Os tratamentos com concentração de 10% de melaço apresentaram os menores valores de tensão superficial do extrato não-diluído (Figura 3.1 A). No entanto, os menores valores de tensão obtidos nos tratamentos com maior concentração de melaço não significam, necessariamente, a presença de diferentes biossurfactantes, ou uma maior concentração de biossurfactantes no meio, uma vez que a tensão superficial do meio de cultura não-inoculado é também linearmente reduzida pela presença desse resíduo (Figura 3.2 A). Esse fato se deve à adição de solutos a um líquido alterar a sua tensão superficial. Nesse caso, a redução da tensão é devida a uma fraca atração entre as moléculas de água e de soluto, o que acarreta uma preferência do soluto em concentrar-se na interface, reduzindo a tensão superficial (SHAW, 1970).

A tensão superficial dos extratos diluídos 10 vezes foi significativamente reduzida com o aumento da concentração de melaço no meio de cultura (Figura 3.1 B), porém foram um pouco mais elevados do que os obtidos nos respectivos extratos não-diluídos. Esse aumento foi atribuído à diminuição do efeito do melaço sobre a tensão superficial, em decorrência da diluição do extrato em água (Figura 3.2 B) e não ao fato de a concentração de biossurfactantes ter atingido valores abaixo da CMC.

Tabela 3.5. Equações estimadas, valores recomendados de melaço (M), nitrogênio (N) e Ferro (Fe) e valores previstos pelo modelo (\hat{Y}) para os isolados bacterianos e para as culturas mistas estudadas

Isolado/ Cultura mista	Variáveis	Modelo estimado	Valor	Valores recomendados			\hat{Y}^{**}
				M (%)	N (mmol L ⁻¹)	Fe (mmol L ⁻¹)	
LBBMA 88A	Tensão superficial	$Y = 26,5693 - 0,1199*M$	0,001	10	0	0	25,37
	Diluição de 10X	$Y = 27,6159 - 0,2378*M$	0,001	10	0	0	25,24
	Diluição de 100X	$Y = 42,7235 - 0,6633*M$	0,002	10	0	0	36,09
	Taxa respiratória	$Y = 56,387 + 3,672*M$	0,000	10	0	0	9,31
LBBMA 155	Tensão superficial	$Y = 22,8213 + 0,7455*M - 0,0507*M^2$	<0,012	2	0	0	24,11
	Diluição de 10X	$Y = 5,93092 + 6,50211*M + 0,30282*N - 0,43884*M^2 - 0,00291*N^2$	0,000	2	0	0	17,18
	Diluição de 100X	$Y = 23,8628 + 11,7403*M - 0,8226*M^2$	<0,010	2	0	0	44,05
	Taxa respiratória	$Y = 35,1066 + 11,8257*M - 0,7904*M^2$	<0,037	7,48	0	0	7,93
LBBMA 283	Tensão superficial	$Y = 24,2195 + 0,1782*M - 0,0110*N + 0,4468*Fe - 0,0118*M^2 + 0,0001*N^2 - 0,3349*Fe^2$	<0,022	2	55	0	24,22
	Diluição de 10X	$Y = 28,3066 - 0,0872*N + 0,0006*N^2$	<0,016	2	67,66	0	25,36
	Diluição de 100X	$Y = 54,3069 - 0,5900*N + 0,0043*N^2$	<0,014	2	68,61	0	34,07
	Taxa respiratória	$Y = 32,5410 + 13,1025*M + 0,5528*N - 0,6586*M^2 - 0,0046*N^2$	<0,022	9,95	60,02	0	11,43
CM 1	Tensão superficial	ns	-	2	0	0	26,73
	Diluição de 10X	ns	-	2	0	0	28,11
	Diluição de 100X	ns	-	2	0	0	40,83
	Taxa respiratória	$Y = 28,6171 + 11,2406*M - 0,5041*M^2$	<0,036	10	0	0	9,06
CM 2	Tensão superficial	$Y = 27,6777 - 0,1566*M$	0,000	10	0	0	26,11
	Diluição de 10X	$Y = 29,9455 - 0,8356*M + 0,0484*M^2$	<0,006	8,64	0	0	26,34
	Diluição de 100X	$Y = 48,7823 - 3,6927*M + 0,2421*M^2$	0,000	7,63	0	0	34,70
	Taxa respiratória	$Y = 28,2680 + 16,5504*M - 6,6014*Fe - 0,8645*M^2$	<0,010	9,57	0	1,5	9,76
CM 3	Tensão superficial	ns	-	2	0	0	25,05
	Diluição de 10X	ns	-	2	0	0	26,58
	Diluição de 100X	$Y = 43,8023 - 0,1245*N$	<0,042	2	67,93	0	33,86
	Taxa respiratória	$Y = 50,1987 + 5,5162*M + 0,3676*N + 2,1124*Fe + 11,3688*Fe^2 - 0,4174*N*Fe$	<0,028	10	100	0	14,21
CM 4	Tensão superficial	$Y = 27,1197 - 0,1295*M$	0,000	10	0	0	25,82
	Diluição de 10X	$Y = 27,1395 - 0,1358*M$	0,000	10	0	0	25,78
	Diluição de 100X	ns	-	2	0	0	34,20
	Taxa respiratória	ns	-	2	0	0	61,88

* - Coeficientes significativos a 5%.

ns - Regressões não-significativas a 5%.

** - Tensão superficial: mJ m⁻²; Taxa respiratória: $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{h}^{-1}$ de CO₂

O aumento da concentração de melão no meio utilizado para o crescimento microbiano reduz linearmente a tensão superficial do extrato diluído 100 vezes (Figura 3.1 C). Nesse caso, a diferença entre a tensão dos tratamentos não está relacionada ao efeito direto do melão sobre a tensão superficial, uma vez que nessa diluição, o resíduo não mais exerce tal influência (Dado não-mostrado).

A equação que melhor representa o efeito da concentração dos biossurfactantes nos extratos brutos são os obtidos com o extrato diluído 100 vezes (Figura 3.1 C). Nessa diluição, não existe mais influência direta do melão sobre a tensão superficial e a concentração de biossurfactantes esta abaixo da CMC. A relação inversa mostra que a maior produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* LBBMA 88A foi obtida quando se aumenta a concentração de melão no meio de cultura.

O aumento da concentração de melão promoveu igualmente um aumento da taxa respiratória de *P. aeruginosa* LBBMA 88A (Figura 3.1 D). Nesse caso, esse comportamento pode ser atribuído a uma maior concentração de células já que a produção de biossurfactante acompanhou essa mesma tendência - maior produção de biossurfactantes, observada pelos menores valores de tensão, em maiores concentrações de melão (Figura 3.1 C). Essa possibilidade se faz aceita, pois a produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* é regulada por um mecanismo de *quorum sensing*, o sistema *rhl* (KOCH *et al.*, 1989; PEARSON *et al.*, 1997).

Apesar da produção de biossurfactantes por isolados de *Pseudomonas* ser estimulada pela escassez de nitrogênio no meio (GUERRA SANTOS *et al.*, 1984; MULLIGAN e GIBBS, 1989; SOBERON-CHAVEZ *et al.*, 2005), a presença desse elemento no meio de cultura não foi determinante na produção de biossurfactante pelo isolado *P.aeruginosa* LBBMA 88A, uma vez que esse fator no modelo não se mostrou significativo (Tabela 3.5). Possivelmente, a predominância do nitrato como fonte de nitrogênio no melão tenha interferido, pois a assimilação desse elemento é lenta o suficiente para simular uma condição de limitação de nitrogênio, mesmo em concentrações mais elevadas. A lenta assimilação do nitrato como fonte de nitrogênio tem sido atribuída a necessidade de ser reduzido a amônio, antes da assimilação pelo metabolismo da glutamina-glutamato (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1986).

Alta relação C/N, entre 16:1 e 18:1, foi apontada como a melhor relação para se obter maiores produções de ramnolipídeos (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1986). Apesar da relação C/N em meio contendo melão a 10% ser próxima a 40:1, redução na tensão

superficial e a permanência dos valores de tensão após diluição de 10 vezes foram observadas, fatos que asseguram a presença de biossurfactante no meio.

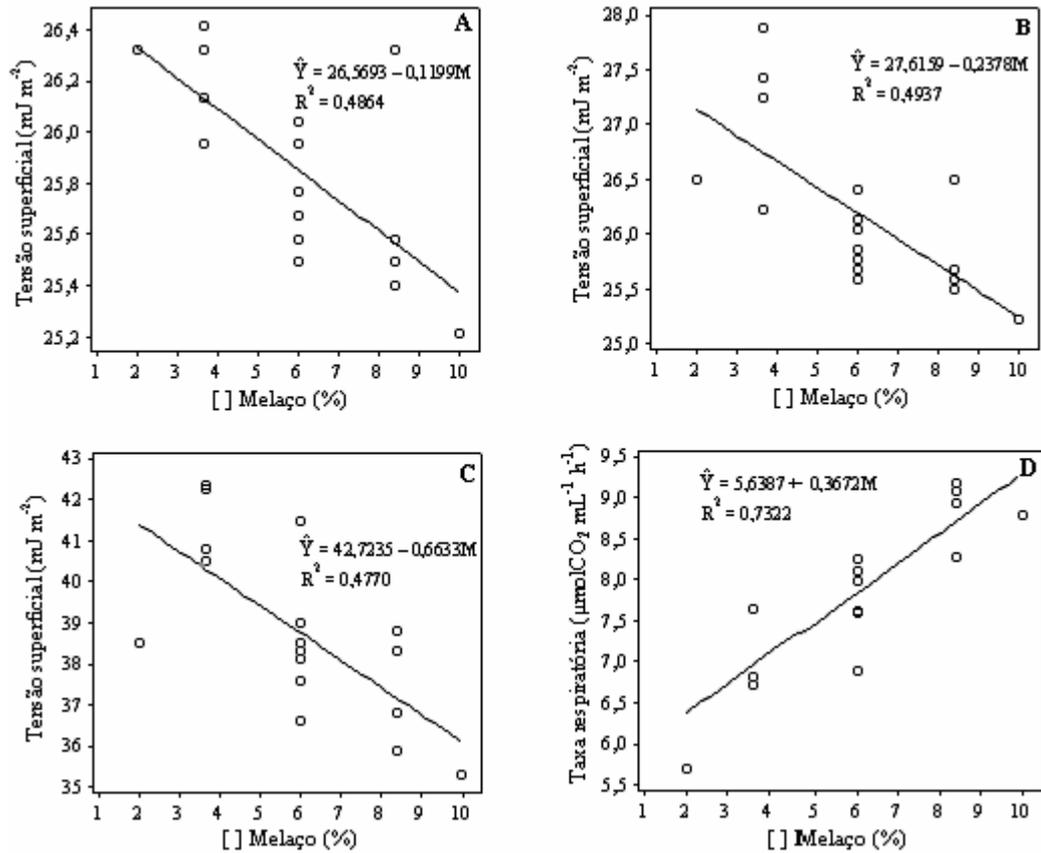


Figura 3.1. Modelos de regressão obtidos para a tensão superficial do extrato livre de células puro e diluído e para a taxa respiratória de *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A. O microrganismo foi inoculado em meio de cultura composto de manipueira a 50% (v/v) e de melaço em concentrações variando de 2% a 10 % (v/v), ao qual foram adicionados nitrogênio e ferro em concentrações variando de 2,25 a 102,25 mmol L⁻¹ e 0 a 1,5 mmol L⁻¹, respectivamente. O isolado foi incubado a 30°C e a 200 rpm durante 72 horas. (A) tensão superficial do extrato livre de células puro; (B) tensão superficial do extrato livre de células diluído 10 vezes; (C) tensão superficial do extrato livre de células diluído 100 vezes; (D) taxa respiratória.

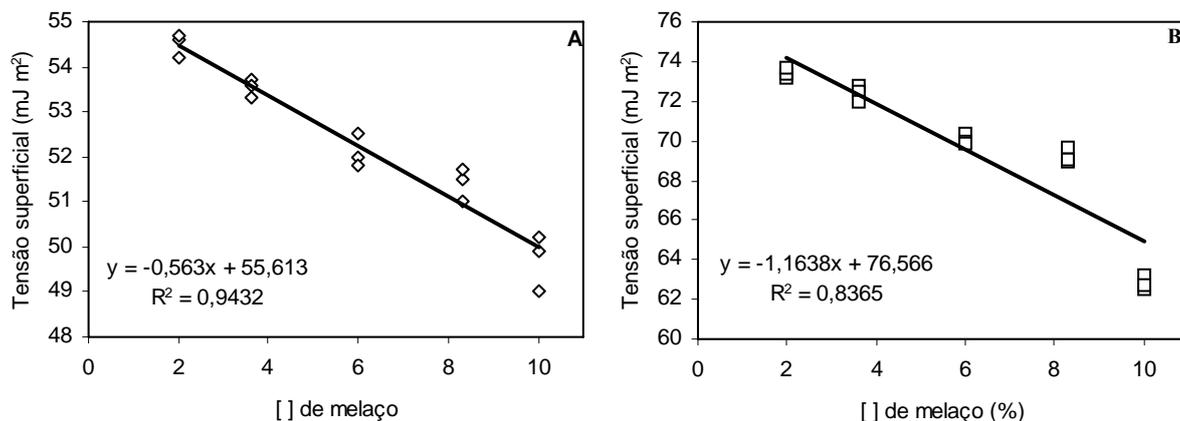


Figura 3.2. Modelos de regressão obtidos para tensão superficial do meio não inoculado composto de manipueira a 50% (v/v) e de melão em concentrações variando de 2% a 10 % (v/v). Tensão superficial do meio sem diluição (A) e diluído 10 vezes (B).

Todas as variáveis estudadas com *Bacillus subtilis* LBBMA 155 enquadraram-se em um modelo de regressão quadrático (Figura 3.3). A tensão superficial do extrato puro e a taxa respiratória foram influenciadas apenas pela concentração de melão no meio de cultura ($p < 0,037$). O menor valor de tensão superficial do extrato puro estimado pelo modelo foi de 24,1 mJ m⁻² (Figura 3.3 A), para o meio com 2% de melão. A maior produção de biossurfactantes no meio contendo menor concentração de melão está confirmada pelos dados de tensão superficial nos extratos diluídos (Figuras 3.3. B e 3.3. E). Eles demonstram o aumento da tensão superficial com o aumento da concentração de melão.

O maior valor estimado para taxa respiratória na concentração equivalente ao ponto de máximo da curva foi de 7,93 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e corresponde a 7,48% de melão (Tabela 3.5 e Figura 3.3 D). Logo, o aumento na concentração de melão do meio não levou à maior atividade de biossurfactantes, embora tenha aumentado a taxa respiratória. Possivelmente, ocorreu um menor crescimento desse isolado em meio com altas concentrações de açúcar, comportamento também observado por Fernandes (2007) quando esse isolado teve seu crescimento inibido em condições de anaerobiose em meio com concentração de glicose de 6% (p/v) (dados não-publicados), e que afetou diretamente a produção dos biossurfactantes. A inibição da produção de biossurfactantes por *Bacillus* em meio de cultura contendo 9% de melão também foi relatada por Joshi *et al* (2008), porém os autores não estabeleceram a causa dessa inibição. Ressalta-se que o aumento da taxa respiratória, como resposta ao aumento na

concentração de melão, pode, nesse caso, não significar necessariamente maior taxa de crescimento ou maior concentração de células no meio, como descrito para o isolado LBBMA 88A. Esse fato é devido a atividade respiratória de microrganismos ser influenciada pelo estado metabólico da célula e ser intensificada sob condições de estresse (MOAT *et al.*, 2002).

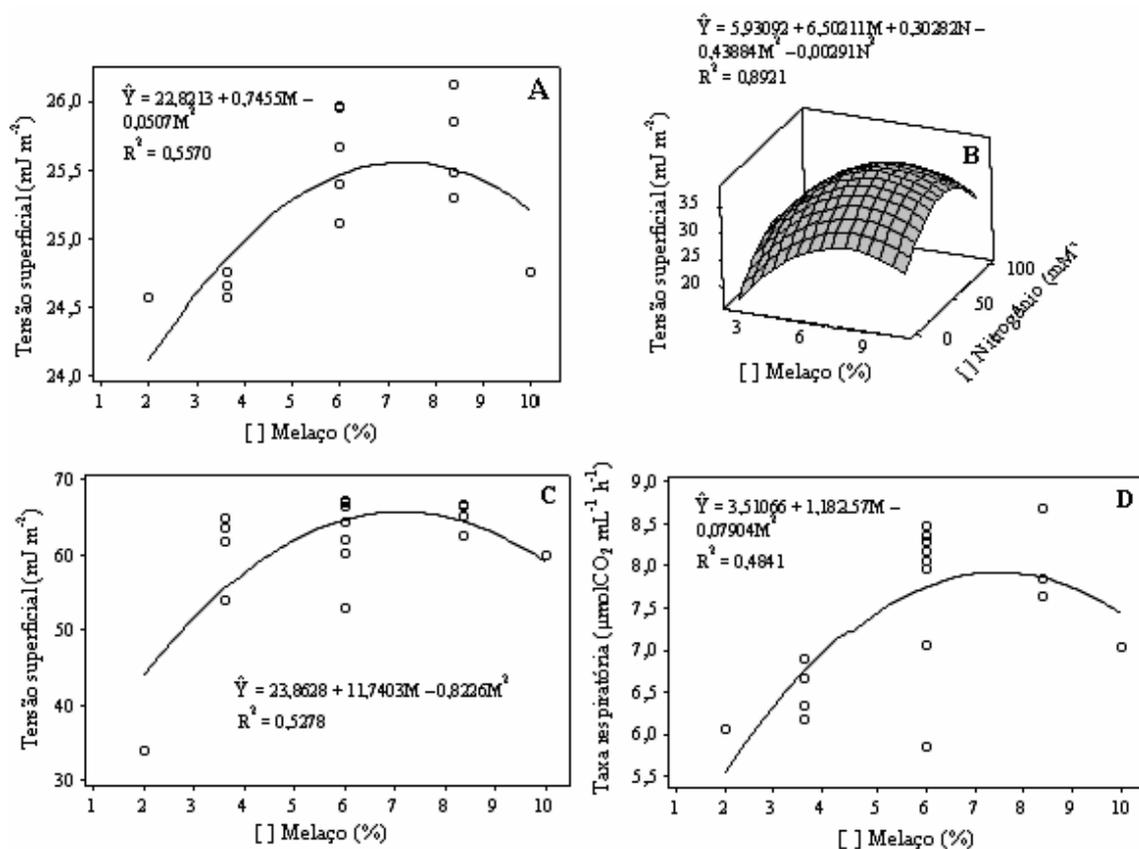


Figura 3.3. Modelos de regressão obtidos para a tensão superficial do extrato livre de células puro e diluído e para a taxa respiratória de *Bacillus subtilis* LBBMA 155. O microrganismo foi inoculado em meio de cultura composto de maniveira a 50% (v/v) e de melão em concentrações variando de 2% a 10% (v/v), ao qual foram adicionados nitrogênio e ferro em concentrações variando de 2,25 a 102,25 mmol L⁻¹ e 0 a 1,5 mmol L⁻¹, respectivamente. O isolado foi incubado a 30°C e a 200 rpm durante 72 horas. (A) tensão superficial do extrato livre de células puro; (B) tensão superficial do extrato livre de células diluído 10 vezes; (C) tensão superficial do extrato livre de células diluído 100 vezes; (D) taxa respiratória.

Os modelos de regressão para os dados de tensão superficial permitem afirmar que a concentração de nitrogênio influencia a concentração de biossurfactante produzido no meio (Figura 3.3B e 3.3C). No extrato diluído 10 vezes, a tensão superficial no tratamento com 50 mmol L⁻¹ de nitrogênio foi maior do que a obtida nos

tratamentos que não receberam fonte adicional do elemento. Os tratamentos com níveis mais elevados de nitrogênio também mostraram tendência à redução da tensão. Em síntese, conclui-se que o nitrogênio fornecido pelos resíduos que constituem o meio de cultura foi suficiente para suprir a demanda do elemento para o crescimento microbiano e a produção de biossurfactantes. Assim como descrito para o isolado *P.aeruginosa* LBBMA 88A o estímulo à produção de biossurfactantes pelo isolado *B. subtilis* LBBMA 155 pode estar associado a uma condição de limitação de nitrogênio. A produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332 é influenciada pelo metabolismo de nitrogênio e os melhores rendimentos são obtidos quando a bactéria cresce sob condições de limitação de nitrogênio (DAVIS *et al*, 1999). Excesso de nitrogênio para a produção de biossurfactantes por isolados do gênero *Bacillus* não tem sido reportado.

O modelo de regressão baseado na diluição de 100 vezes do extrato foi significativo para o fator concentração de melaço (Figura 3.3. C), e não-significativo para os fatores concentração de nitrogênio e concentração de ferro. A tensão superficial aumentou com o aumento da concentração de melaço. Os altos valores de tensão nos demais tratamentos indicam que a concentração de biossurfactantes, nos extratos diluídos 100 vezes, estava muito abaixo da CMC. Esses dados são uma representação mais adequada da concentração de biossurfactantes nos diferentes tratamentos, por não sofrerem influência da formação de micelas, a partir do que a tensão superficial do fluido mantém-se inalterada. Conclui-se, portanto, que a produção de biossurfactantes por *B. subtilis* LBBMA 155 é maior no meio de cultura com 2% de melaço do que nos meios com concentrações mais elevadas desse resíduo, não havendo necessidade de acréscimo de nitrogênio ou de ferro às quantidades fornecidas pelo meio de cultura.

Os dados de tensão superficial e de taxa respiratória do isolado *B. subtilis spizizenii* LBBMA 283, em resposta a variações nas concentrações de melaço, nitrogênio e ferro no meio de cultura, foram explicados por modelos de regressão quadráticos (Figura 3.4). A tensão superficial do extrato puro foi influenciada por todos os fatores estudados ($p < 0,022$). O menor valor de tensão superficial estimado ($24,2 \text{ mJ m}^{-2}$) foi obtido no meio contendo 2% de melaço, 55 mmol L^{-1} de nitrogênio e sem fonte adicional de ferro (Tabela 3.5). Assim como observado para o isolado *B. subtilis* LBBMA 155, o aumento na concentração de melaço do meio não levou a uma maior atividade de biossurfactantes, expressa como maior redução da tensão superficial (Figura 3.4 A). Desta forma, pode-se afirmar que a concentração de melaço acima do

mínimo utilizado neste estudo (2% p/v) não propicia menores valores de tensão superficial pelo isolado *B. subtilis spizizenii* LBBMA 283.

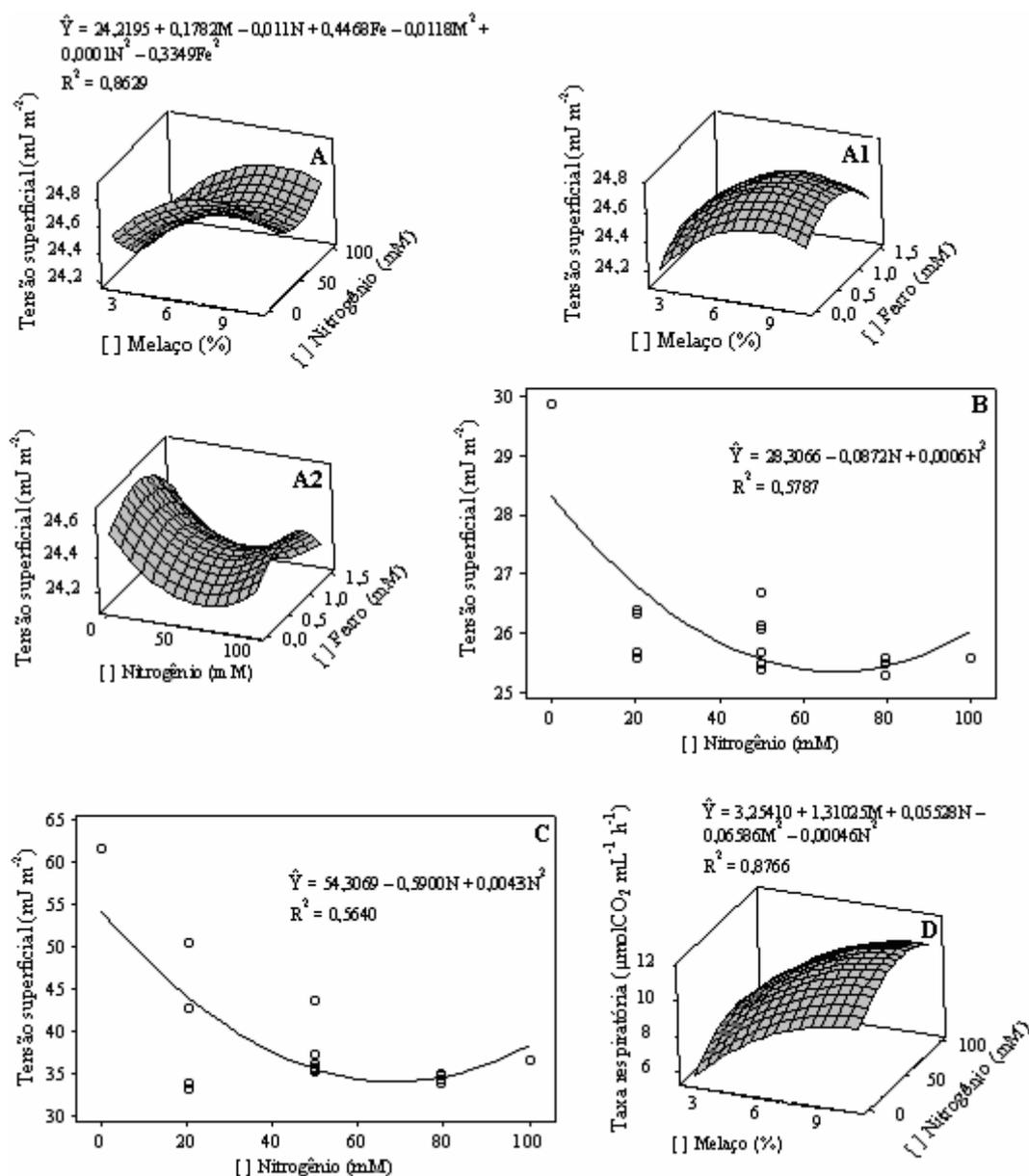


Figura 3.4. Modelos de regressão obtidos para a tensão superficial do extrato livre de células puro e diluído e para a taxa respiratória de *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 283. O microrganismo foi inoculado em meio de cultura composto de manipueira a 50% (v/v) e de melão em concentrações variando de 2% a 10% (v/v), ao qual foram adicionados nitrogênio e ferro em concentrações variando de 2,25 a 102,25 mmol L^{-1} e 0 a 1,5 mmol L^{-1} , respectivamente. O isolado foi incubado a 30°C e a 200 rpm durante 72 horas. (A) tensão superficial do extrato livre de células puro em função de melão e nitrogênio; (A1) tensão superficial do extrato livre de células puro em função de melão e ferro; (A2) tensão superficial do extrato livre de células puro em função de nitrogênio e ferro (B) tensão superficial do extrato livre de células diluído 10 vezes; (C) tensão

superficial do extrato livre de células diluído 100 vezes; (D) taxa respiratória.

A tensão superficial dos extratos diluídos 10 e 100 vezes não foi influenciada pela concentração de melão do meio de crescimento (Figuras 3.4 B e 3.4 C). O extrato diluído 100 vezes (Figura 3.4 C) demonstrou que a produção de biossurfactantes por esse isolado foi influenciada pela concentração de nitrogênio no meio, ou seja, a quantidade do elemento fornecida pelos componentes do meio de cultura (melão e manipueira) é menor do que a demandada pelo microrganismo. A concentração de nitrogênio total no meio com melão a 2% (p/v) é de 0,12 g L⁻¹, valor inferior ao geralmente utilizado para essa espécie, 3 g L⁻¹ (SEPAHY *et al.*, 2005; RAMMANI *et al.*, 2005). Apesar do comportamento observado ser contrário ao apresentado pelo isolado *B. subtilis* LBBMA 155, a literatura cita que para alguns isolados desse gênero, a deficiência de nitrogênio no meio afeta negativamente o crescimento e o rendimento da produção de biossurfactantes (MAKKAR e CAMEOTRA, 1997; 1998; DAS e MUKHERJEE, 2007).

A concentração de ferro não teve efeito significativo sobre a tensão superficial dos extratos diluídos, que melhor representam a concentração de biossurfactantes no meio de cultura (Figuras 3.4. B e 3.4 C). Conclui-se que, em meio de cultura formulado à base de melão e manipueira, a adição de ferro além do oferecido pela composição do meio não influencia a produção de biossurfactantes por *B. subtilis spizizenii* LBBMA 283, embora a concentração fornecida pelo meio melão 2% ser de apenas 3,7 x 10⁻⁴ g L⁻¹, aproximadamente 0,02 mmol L⁻¹.

A ausência de resposta dos isolados de *Bacillus* à concentração de ferro no meio de cultura não era esperado e difere dos padrões descritos na literatura. Wei *et al.* (2004) verificaram que a adição de 4 mmol L⁻¹ de Fe²⁺ estimula o crescimento celular e a produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332, mas a adição do elemento em concentrações acima dessa causa acidificação do meio de cultura, levando à precipitação do biossurfactante e à redução na viabilidade das células. Segundo o próprio autor, o mecanismo do aumento da produção de surfactina associado à concentração de ferro ainda não é completamente explicado. A necessidade extra de ferro pode estar relacionada ao efeito quelante da surfactina sobre esses íons, o que levaria redução na biodisponibilidade.

Os dois isolados do gênero *Bacillus* em estudo, *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis spizizenii* LBBMA 283, apresentaram menor requerimento de fonte de carbono (melaço) para a máxima produção de biossurfactantes do que o isolado *P. aeruginosa* LBBMA 88A. *P. aeruginosa* já foi descrita na literatura por obter maior rendimento em meio mineral suplementado com 10% de melaço (RASHEDI *et al.*, 2005). Para *Bacillus*, a literatura cita espécies de *B. licheniformis* e *B. subtilis*, apresentando máxima produção de biossurfactante em concentrações de melaço de 5,0 – 7,0% (w/v), porém em condições termofílicas (JOSHI *et al.*, 2008).

A tensão superficial dos extratos livres de células da cultura mista 1 (CM 1), composta dos isolados *P. aeruginosa* LBBMA 88A e *B. subtilis* LBBMA 155, não foi influenciada por nenhum dos fatores estudados (Figuras 3.5 A a 3.5 C). A diluição do extrato em 10 vezes causou uma pequena elevação da tensão superficial, a qual foi atribuída à redução da concentração de solutos no meio, assim como já discutido para o isolado LBBMA 88A (Figura 3.1 A). Portanto, é possível concluir que CM1 foi capaz de produzir biossurfactantes em meio composto de melaço e manipueira, os quais foram capazes de reduzir a tensão superficial dos extratos não-purificados para valores entre 26,7 mJ m⁻² e 28,1 mJ m⁻² (Tabela 3.5 e Figura 3.5).

O aumento da concentração de melaço no meio de cultura resultou em aumento significativo ($p < 0,036$) da taxa respiratória da CM 1 (Figura 3.5 D). A atividade respiratória não foi influenciada pela adição de nitrogênio ou de ferro. No meio contendo melaço a 10% (v/v), a taxa respiratória foi equivalente a 9,1 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

A resposta da CM1 à variação da concentração dos fatores testados (melaço, nitrogênio e ferro), em termos de produção de biossurfactantes (expressa mais adequadamente pelos dados de tensão superficial do extrato diluído 100 vezes) (Figura 3.5 C), retrata uma posição intermediária entre as respostas dos dois isolados que a compõem. Esses isolados apresentaram resposta antagônica à variação especialmente da concentração de melaço, no sentido de que a produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* LBBMA 88A foi estimulada pelo aumento da concentração de melaço (Figuras 3.1 C), enquanto que esse aumento resultou em menor produção de biossurfactantes por *B. subtilis* LBBMA 155 (Figuras 3.3 D). O valor de tensão superficial do extrato diluído 100 vezes (40,8 mJ m⁻²) (Figura 3.5 C) é similar ao dos extratos de mesma diluição do isolado *P. aeruginosa* LBBMA 88A (Figura 3.1C), mas bem inferior aos extratos dos meios inoculados com o isolado *B. subtilis* LBBMA 155

contendo melaço em concentração acima de 2% (Figura 3.3 D). Esses dados indicam que, nos meios com maior concentração de carbono inoculados com a CM1, o isolado *P. aeruginosa* LBBMA 88A foi o principal responsável pela produção de biosurfactantes.

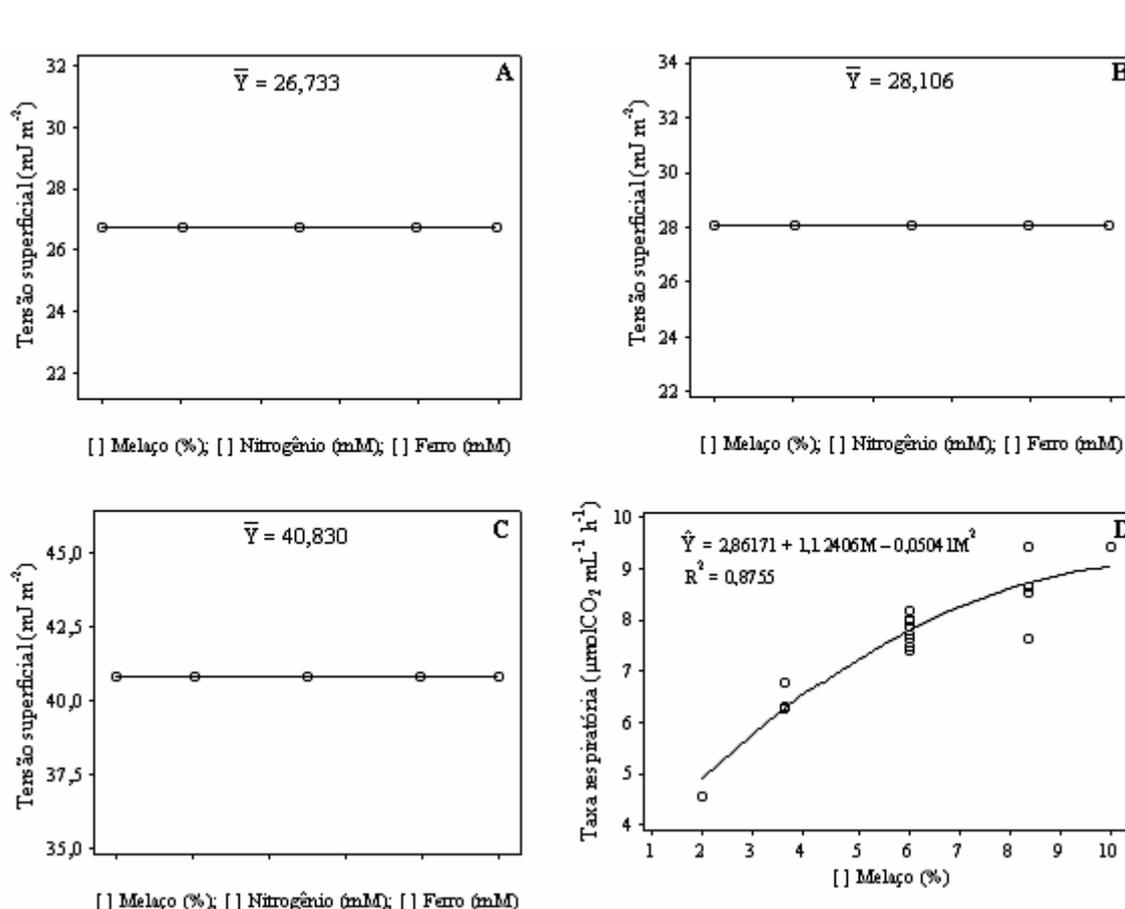


Figura 3.5. Modelos de regressão obtidos para a tensão superficial do extrato livre de células puro e diluído e para a taxa respiratória da cultura mista CM1, composta por *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A e *Bacillus subtilis* LBBMA 155. Os microrganismos foram inoculados em meio de cultura composto de manipueira a 50% (v/v) e de melaço em concentrações variando de 2% a 10 % (v/v), ao qual foram adicionados nitrogênio e ferro em concentrações variando de 2,25 a 102,25 mmol L⁻¹ e 0 a 1,5 mmol L⁻¹, respectivamente. As culturas foram incubadas a 30°C e a 200 rpm durante 72 horas. (A) tensão superficial do extrato livre de células puro; (B) tensão superficial do extrato livre de células diluído 10 vezes; (C) tensão superficial do extrato livre de células diluído 100 vezes; (D) taxa respiratória.

A tensão superficial dos extratos livres de células e a taxa respiratória da cultura mista 2 (CM 2), composta dos isolados *P. aeruginosa* LBBMA 88A e *B. subtilis* spizizenii LBBMA 283, foram influenciadas significativamente pela concentração de

melaço no meio de cultura ($p < 0,022$). A tensão superficial do extrato puro diminuiu linearmente com o aumento da concentração de melaço no meio (Figura 3.6 A).

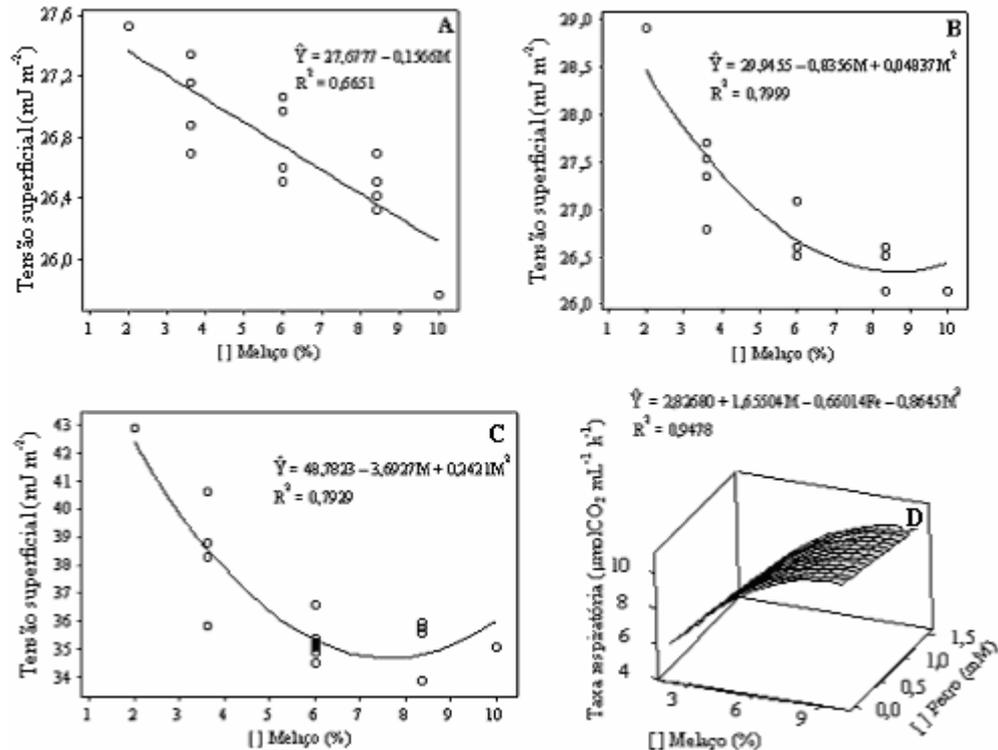


Figura 3.6. Modelos de regressão obtidos para a tensão superficial do extrato livre de células puro e diluído e para a taxa respiratória da cultura mista CM2, composta por *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A e *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 283. Os microrganismos foram inoculados em meio de cultura composto de manipueira a 50% (v/v) e de melaço em concentrações variando de 2% a 10% (v/v), ao qual foram adicionados nitrogênio e ferro em concentrações variando de 2,25 a 102,25 mmol L⁻¹ e 0 a 1,5 mmol L⁻¹, respectivamente. As culturas foram incubadas a 30°C e a 200 rpm durante 72 horas. (A) tensão superficial do extrato livre de células puro; (B) tensão superficial do extrato livre de células diluído 10 vezes; (C) tensão superficial do extrato livre de células diluído 100 vezes; (D) taxa respiratória.

O menor valor de tensão no extrato puro foi de 26,3 mJ m⁻², obtido no meio de cultura contendo melaço a 10% (v/v). Esse valor manteve-se inalterado após a diluição do extrato em 10 vezes (Tabela 3.5 e Figura 3.6 B), o que indica a produção de biossurfactantes em concentração equivalente a pelo menos 10 vezes a CMC. Resultado similar foi obtido com a cultura pura do isolado *P. aeruginosa* LBBMA 88A (Figuras 3.1 e 3.2). Para o isolado LBBMA 283, os tratamentos com 2% de melaço proporcionaram as menores tensões superficiais. Apesar da resposta da cultura mista ao

aumento da concentração de melação ser similar à observada para o isolado *P. aeruginosa* LBBMA 88A, não é possível afirmar que este isolado tenha sido o principal responsável pela produção de biossurfactantes na CM 2. Os dados de tensão superficial do extrato diluído 10 vezes (Figura 3.6 B) mostram que não há relação linear entre essa variável e a concentração de melação no meio de cultura, resultado diferente do obtido com o isolado *P. aeruginosa* LBBMA 88A em cultura pura (Figura 3.1 B). Além disso, melação e ferro influenciaram significativamente a taxa respiratória, resultado observado somente para o isolado *B. subtilis spizizenii* LBBMA 283 em cultura pura. Esses resultados são um indício de que houve produção de biossurfactantes pelos dois isolados que compõem a CM 2.

A tensão superficial do extrato livre de células da cultura mista 3 (CM 3), composta dos isolados *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis spizizenii* LBBMA 283, e do extrato diluído 10 vezes, não foi influenciada por nenhum dos fatores estudados (Figura 3.7). Porém, a concentração de nitrogênio teve efeito significativo ($p < 0,042$) sobre a tensão superficial do extrato diluído 100 vezes, novamente demonstrando a importância desse fator na produção de biossurfactantes por isolados do gênero *Bacillus*. A resposta da CM 3 ao aumento da concentração de nitrogênio no meio de cultura, retratada pelo aumento da produção de biossurfactantes, foi semelhante à obtida com o isolado *B. subtilis spizizenii* LBBMA 283. Esse resultado é um indício de que este tenha contribuído de forma mais significativa para a produção de biossurfactantes.

A cultura mista CM 3 apresentou resposta complexa da taxa respiratória em relação aos fatores estudados, já que todos foram significativos (Figura 3.7). Houve ainda interação significativa entre todos os fatores estudados, o que demonstra a dificuldade de se estudar o comportamento de uma variável fisiológica de culturas mistas em resposta a variações de múltiplos fatores ambientais.

Conclusivamente, foi demonstrada a produção de biossurfactantes capazes de reduzir a tensão superficial do meio de cultura para 25 mJ m^{-2} por uma cultura mista de *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis spizizenii* LBBMA 283, em concentração igual ou superior a 10 vezes a CMC. Adicionalmente, demonstrou-se que a adição de nitrogênio em concentração igual ou superior a 20 mmol L^{-1} , além da quantidade já suprida pelo meio de cultura, estimula a produção de biossurfactantes por essa cultura.

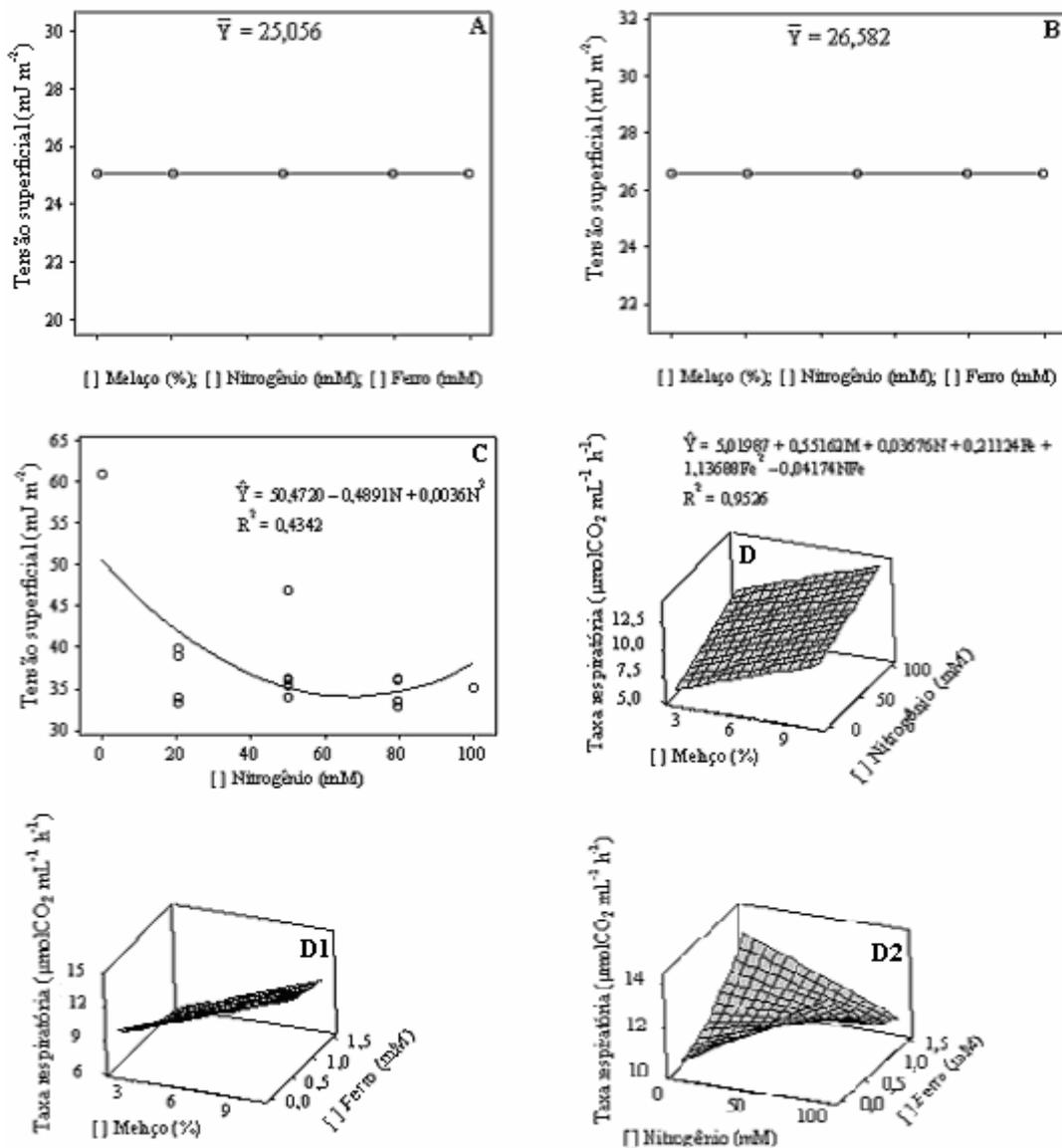


Figura 3.7. Modelos de regressão obtidos para a tensão superficial do extrato livre de células puro e diluído e para a taxa respiratória da cultura mista CM3, composta por *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 283. Os microrganismos foram inoculados em meio de cultura composto de manipueira a 50% (v/v) e de melação em concentrações variando de 2% a 10 % (v/v), ao qual foram adicionados nitrogênio e ferro em concentrações variando de 2,25 a 102,25 mmol L⁻¹ e 0 a 1,5 mmol L⁻¹, respectivamente. As culturas foram incubadas a 30°C e a 200 rpm durante 72 horas. (A) tensão superficial do extrato livre de células puro; (B) tensão superficial do extrato livre de células diluído 10 vezes; (C) tensão superficial do extrato livre de células diluído 100 vezes; (D) taxa respiratória em função de melação e nitrogênio; (D1) taxa respiratória em função de melação e ferro; (D2) taxa respiratória em função de nitrogênio e ferro.

A concentração de melação no meio de cultura foi o único fator que influenciou ($p < 0,002$) a tensão superficial dos extratos puros e diluídos da cultura mista CM 4,

contendo os três isolados utilizados neste estudo (Figura 3.8). A única exceção a esse comportamento foi o extrato diluído 100 vezes, cuja tensão superficial não foi influenciada por quaisquer dos fatores avaliados (Figura 3.8 C). Para o extrato puro, os tratamentos com 10% de melaço apresentaram os menores valores de tensão superficial (Figura 3.8 A), tendência repetida na diluição de 10 vezes (Figura 3.8 B).

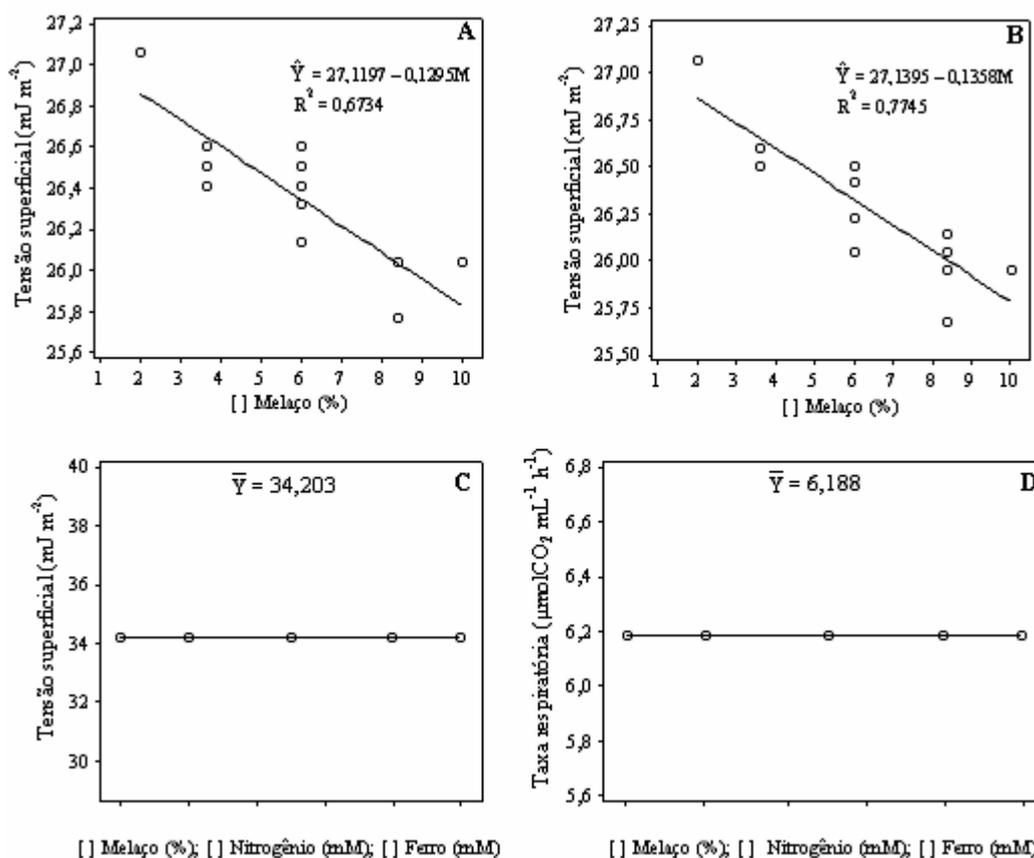


Figura 3.8. Modelos de regressão obtidos para a tensão superficial do extrato livre de células puro e diluído e para a taxa respiratória da cultura mista CM4, composta por *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A, *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 283. Os microrganismos foram inoculados em meio de cultura composto de manipueira a 50% (v/v) e de melaço em concentrações variando de 2% a 10 % (v/v), ao qual foram adicionados nitrogênio e ferro em concentrações variando de 2,25 a 102,25 mmol L⁻¹ e 0 a 1,5 mmol L⁻¹, respectivamente. As culturas foram incubadas a 30°C e a 200 rpm durante 72 horas. (A) tensão superficial do extrato livre de células puro; (B) tensão superficial do extrato livre de células diluído 10 vezes; (C) tensão superficial do extrato livre de células diluído 100 vezes; (D) taxa respiratória.

A permanência da tensão superficial mesmo após diluição de 10 vezes indica que não houve influência do aumento na concentração de melaço no meio, como relatado para o isolado *P. aeruginosa* LBBMA 88A. Por se tratar de uma cultura mista,

é provável a presença nesse extrato de variados biossurfactantes. Biossurfactantes mais eficientes podem inicialmente promover menores valores de tensão superficial, para isso necessitando estar numa concentração, pelo menos, igual a sua CMC. Após as diluições do extrato essas moléculas deixam de atuar e a ação de outros biossurfactantes menos eficientes porém presentes em maior concentração prevalece.

A resposta da CM4 ao aumento da concentração de melaço é similar à observada para o isolado LBBMA 88A, uma indicação que esse isolado teve uma maior contribuição na produção de biossurfactantes quando comparado aos demais. A produção de ramnolípídeos homólogos em diferentes proporções, em resposta ao acréscimo de melaço ao meio, poderia explicar a variação na tensão superficial, uma vez que essas moléculas não apresentam a mesma atividade de superfície.

A comparação dos resultados de cada isolado/cultura mista utilizando-se de um dendrograma (Figura 3.9), resultou que, o menor nível de similaridade encontrado foi entre os isolados LBBMA 88A e LBBMA 155 (98,4016%). A pequena distância apresentada entre ambos (0,0319687) ocorreu em razão das médias similares para as variáveis avaliadas. Ou seja, os isolados/culturas mistas foram diferentes entre si, apresentaram comportamentos diferentes, mas atingiram as mesmas médias de tensão superficial e taxa respiratória.

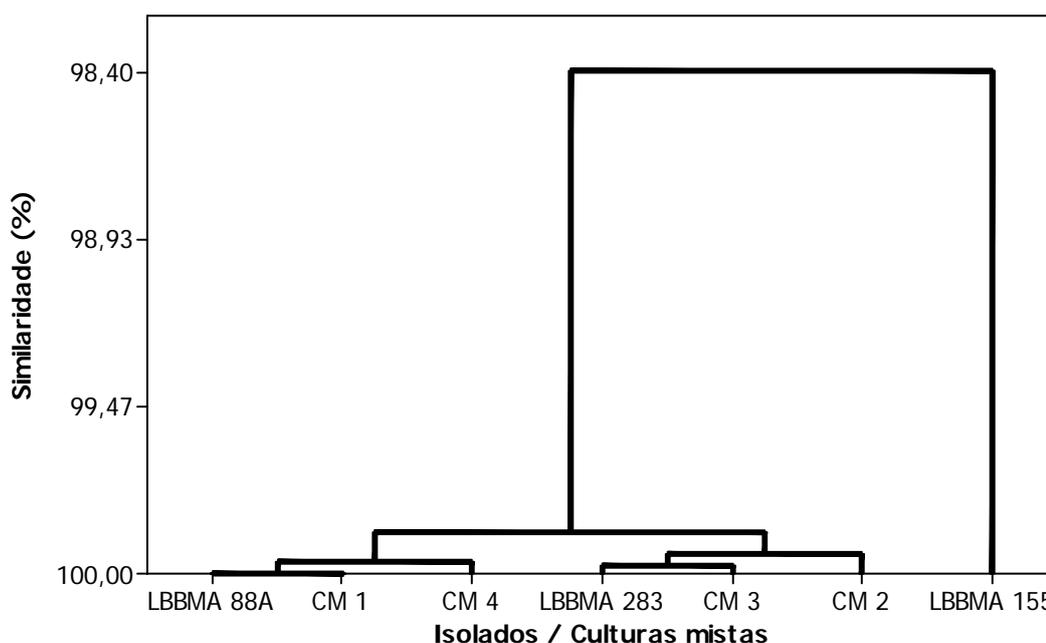


Figura 3.9. Dendrograma representando a similaridade entre isolados/culturas mistas.

Diante da similaridade das médias alcançadas pelos isolados/culturas mistas estudados, conclui-se que todos são promissores como produtores de biossurfactantes, porém, a significância de muitos fatores na produção ou no crescimento do microrganismo deve ser considerada no processo de escolha. Quanto menor o número de fatores com influencia, maior o controle sobre o processo. Isso é verdadeiro especialmente quando o substrato de crescimento do microrganismo possui variações na sua composição, como é caso do melão e da maniveira.

Apesar disso, os isolados/culturas mistas que apresentaram significância para vários fatores, como o *Bacillus subtilis* LBBMA 155, *B. subtilis spizizenii* LBBMA 283, CM 2 (*Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A e *Bacillus subtilis* LBBMA 155) e CM 3 (*Bacillus subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis* spizenii LBBMA 283), não devem ter seu potencial para a produção de biossurfactantes menosprezado. Estudos aprofundados devem ser desenvolvidos, inclusive avaliando a relação custo do processo x produção de biossurfactante.

Pseudomonas aeruginosa LBBMA 88A e a cultura mista CM 4 (*P. aeruginosa* LBBMA 88A, *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis* spizenii LBBMA 283) mereceram maior atenção pelo fato da produção de biossurfactantes por LBBMA 88A e CM 4 ter sido pelo menos 10 vezes acima da sua CMC, o que pode ser observado pela permanência dos valores de tensão superficial após diluição de 10 vezes (Figuras 3.1 e 3.8 A e B). Esse comportamento não é o observado nos demais isolados e culturas mistas estudados. Os resultados alcançados foram atribuídos apenas à variação da concentração de melão, mostrando que tanto o nitrogênio como o ferro não precisam ser fortemente controlados durante o processo produtivo desses biossurfactantes. O comportamento linear apresentado por eles é uma indicação do potencial para se obter valores menores de tensão. Com isso, sugere-se o estudo da influência de concentrações de melão superiores a 10%, visando a obtenção do máximo desempenho do isolado LBBMA 88A e da CM 4.

A utilização de resíduos agroindustriais pode diminuir os custos de produção de biossurfactantes para níveis competitivos, em relação aos surfactantes sintéticos e, ao mesmo tempo, reduzir os problemas ambientais relativos ao descarte inadequado ou aos custos de tratamento dos resíduos.

O melão e a maniveira mostraram-se substratos apropriados para se estabelecer um processo biotecnológico de produção de biossurfactante pelos isolados testados. Porém existe a dificuldade de padronização, influenciada pelas variações naturais da composição dos substratos e, muitas vezes, torna-se necessária a

suplementação de nutrientes e o monitoramento constante, tanto do substrato quanto da produção.

3.4 CONCLUSÕES

Melaço e manipueira mostraram-se bons substratos para a produção de biossurfactante pelos isolados testados. A utilização desses resíduos pode diminuir os custos de produção em escala comercial de biossurfactantes para níveis competitivos, em relação aos similares sintéticos.

A relação custo do processo x produção de biossurfactante para *Bacillus subtilis* LBBMA 155, *B. subtilis spizizenii* LBBMA 283, CM 2 (*P. aeruginosa* LBBMA 88A e *B. subtilis* LBBMA 155) e CM 3 (*B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis spizizenii* LBBMA 283) deverá ser objeto de estudo específico, que inclua os vários fatores significativos para o processo de produção.

Pseudomonas aeruginosa LBBMA 88A e a cultura mista CM 4 (*P. aeruginosa* LBBMA 88A, *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis spizizenii* LBBMA 283) são potencialmente os de maior interesse para a produção de biossurfactante, uma vez que são influenciados apenas pela concentração de melaço e, ainda, por terem alcançado valores de CMC de pelo menos 10 vezes.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUSEOUD, M., MAACHI, R., AMRANE, A., BOUDERGUA, S.; NABI, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, v.223, p.143-151, 2008.

APHA [AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION]; AWWA [AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION]; WEF [WATER ENVIRONMENT FEDERATION]. *Standart methods for the examination of water and wastewater*. 20th. Ed. Washington. D.C.: APHA/AWWA/WEF, 1998, [s.n.].

BANAT, I.M.. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, v.15, n.6, p.591-594, 1993.

BERGSTRÖM, M. Synergistic effects in mixtures of an anionic and a cationic surfactan. *Langmuir*, v.17, p.993-998, 2001.

COOPER, D.G.; PADDOCK, D.A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.47, n.1, p.173-176, 1984.

DANIELS, L., HANSON, R., PHYLLIPS, J.A. *Chemical analysis*. In: Methods for General and Molecular Bacteriology. GERHARDT, P., MURRAY, R.G.E., WOOD, W.A. KRIEG, N.R. eds., American Society for Microbiology, Washington DC., p.518-519, 1994.

DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Characterization of biochemical properties and biological activities of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid and non-mucoid strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil sample. *Applied Microbial Biotechnology*, v.69, p.192-199, 2005.

DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, v.98, p.1339-1345, 2007.

DAVIS, D.A.; LYNCH, H.C.; VARLEY, J. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enzime and Microbial Technology*, v.25, p.322-329, 1999.

ESPUNY, M.J., EGIDO, S., RODÓN, I., MANRESA, A.; MERCADÉ, M.E. Nutricional requirements of a biosurfactant producing strain *Rhodococcus* sp. 51T7. *Biotechnology Letters*, v.18, n.5, p.521-526, 1996.

FERNANDES, P.L. *Produção de biossurfactantes por Bacillus spp. em condições anaeróbia*. 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

GHURYE, G.L.; VIPULANANDAN, C. A practical approach to biosurfactant production using nonaseptic fermentation of mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, v.44, p.661-666, 1994.

GOMES, J.C. *Análises de alimentos*. Departamento de Tecnologia de alimentos/FUNARBE, Viçosa, UFV, 1996.

GUERRA-SANTOS, L., KAPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Applied and Environmental Microbiology*, v.48, n.2, p.301-305, 1984.

ILORI, M.O., AMOBI, C.J.; ODOCHA, A.C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. *Chemosphere*, v.61, p.985-992, 2005.

JANG, L.K.; CHANG, P.W., FINDLEY, J.E.; YEN, T.F. Selection of bacteria with favorable transport properties through porous rock for the application of microbially enhanced oil recovery. *Applied Environmental Microbiology*. v.46, n.5, p.1066-1072, 1983.

JOSHI, S., BHARUCHA, C., JHA, S., YADAV, S., NERURKAR, A.; DESAI, A.J.. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, v.99, p.195-199, 2008.

KIEHL, E.J. *Fertilizantes orgânicos*. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres Ltda., 1985. 492p.

KOCH, A. K.; KAPPELI O.; FIECHTER A.; REISER J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Journal Bacteriology*, v.173, p.4212-4219, 1989.

LI, Q., KANG, C., WANG, H., LIU, C.; ZHANG, C. Application of microbial enhanced oil recovery technique to Daqing Oilfield. *Biochemical Engineering Journal*, v.11, p.197-199, 2002.

MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S. Effects of various nutritional supplements on biosurfactant production by a strain of *Bacillus subtilis* at 45°C. *Journal of Surfactants and Detergents*, v.5, n.1, p.11-17, 2002.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.18, p.37-42, 1997.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.20, p.48-52, 1998.

McINERNEY, M.J.; DUNCAN, K.E.; YOUSSEF, N. FINCHER, T.; MAUDGALYA, S.K.; FOLMSBEE, M.J.; KNAPP, R.; SIMPSON, R. R.; RAVI, N.; NAGLE, D. Development of microorganisms with improved transport and biosurfactant activity for enhanced oil recovery. In _____. *Microbial strains with improved transport ability through model porous systems*. Final Report, p. 100-114, 2005.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, v.31, p.426-428, 1959.

MOAT, A.G.; FOSTER, J.W.; SPECTOR M.P. *Microbial Physiology*. Fourth Edition. New York. Editora Wiley-Liss.714p, 2002.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. *TRENDS in Biotechnology*, v.24, n.11, p.509-515, 2006.

- MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.55, n.11, p.3016-3019, 1989.
- NADARAJAH, N., SINGH, A.; WARD, O.P. Evaluation of a mixed bacterial culture for de-emulsification of water-in-petroleum oil emulsions. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.18, p.435-440, 2002.
- NITSCHKE, M., FERRAZ, C.; PASTORE, G.M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.35, p.81-85, 2004.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology*, v.97, p.336-341, 2006.
- OKPOKWASILI, G.C.; IBIENE, A.A. Enhancement of recovery of residual oil using a biosurfactant slug. *African Journal of Biotechnology*, v.5, n.5, p.453-456, 2006.
- PATEL, R.M.; DESAI, A.J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Letters in Applied Microbiology*, v.25, p.91-94, 1997.
- PEARSON, J.P., PESCI, E.C.; IGLEWSKI, B.H. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *Journal of Bacteriology*, v.179, n.18, p.5756-5767, 1997.
- RAMNANI, P., KUMAR, S.S.; GUPTA, R. Concomitant production and downstream processing of alkaline protease and biosurfactant from *Bacillus licheniformis* RG1: bioformulation as detergent additive. *Process Biochemistry*, v.40, p.3352-3359, 2005.
- RASHEDI, H., ASSADI, M.M., BONAKDARPOUR, B.; JAMSHIDI, E. Environmental importance of rhamnolipid production from molasses as a carbon source. *Environmental Science & Technology*, v.2, n.1, p.59-62, 2005.
- REASONER, D.J.; GELDREICH, E.E. A new medium for enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, v.49, n.1, p.1-7, 1985.
- REISER, J., KOCH, A.K., JENNY, K.; KAPPELI, O. Structure, properties and production of biosurfactants. In: *Advances in Applied Biotechnology Series*, v.3: Biotechnology for aerospace applications. ORINGER, J.W., TILLINGUEST, H.S. eds., Gulf Publishing Company, London, p.85-97, 1998.
- RISMANI, E., FOOLADI, J.; EBRAHIMI, G.H. Biosurfactant production in bath culture by a *Bacillus licheniformis* isolated from the Persian Gulf. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v.9, n.13, p.2498-250, 2006.
- RODRIGUES, L.R., TEIXEIRA, J.A.; OLIVEIRA, R. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, v.32, p.135-142, 2006.
- ROUKAS, T. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. *Process Biochemistry*, v.33, p.8, p.805-810, 1998.

SEPAHY., A.A., ASSADI, M.M., SAGGADIAN, V.; NOOHI, A. Production of biosurfactant from Iranian oil fields by isolated Bacilli. *International Journal of Environmental Science & Technology*, v.1, n.4, p.287-293, 2005.

SHAW, D.J. Introduction to colloid and surface chemistry. Editora Edgard Blucher Ltda. 181p, 1970.

SOBERON-CHAVEZ, G., LEPINE, F.; DEZIEL, E.. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbial Biotechnology*, v.68, p.718-725, 2005.

TABATABAEE, A., ASSADI, M.M., NOOHI, A.A.; SAJADIAN, V.A. Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs. *Iranian Journal Environmental Health Science & Engineering*, v.2, n.1, p.6-12, 2002.

WEI, Y., LAI, C.; CHANG, J. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Process Biochemistry*, v.42, p.40-45, 2007.

WEI, Y., WANG, L.; CHANG, J. Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress*, v. 20, p.979-983, 2004.

WEI, Y.; WANG, L.; CHANG, J.; KUNG, S. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 96, n.2, p.174-178, 2003.

YAKIMOV, M.M.; MOHAMMED, M.A.; BOCK, M.; BOSEKER, K.; FREDRICKSON, H.L.; KESSEL, D.G.; TIMMIS, K.N. The potential of *Bacillus licheniformis* strains for in situ enhanced oil recovery. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v.18, p.147-160, 1997.

YANG, J.E.; SKOGLEY, E.O.; SCHASS, P.E.; KIM, J.J. A simple spectrophotometric determination of nitrate in water, resin and extracts. *Soil Science Society of America Journal*, v.62, p1108-1115, 1998.

ZHU, L.; FENG, S. Synergistic solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons by mixed anionic-nonionic surfactants. *Chemosphere*, v.53, p.459-467, 2003.

CAPITULO 4

ESTUDO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO PELO ISOLADO *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A EM MEIO COMPOSTO POR MELAÇO E MANIPUEIRA

RESUMO

Biossurfactantes são metabólitos secundários com propriedades ativas de superfície sintetizados por uma grande variedade de microrganismos. Esses compostos têm sido aplicados em processos de recuperação de óleo em rochas-reservatórios, por diminuírem a tensão interfacial da interface óleo-rocha. A diminuição dessa tensão reduz as forças capilares que impedem o movimento do óleo através dos poros da rocha. Além disso, podem ainda reduzir a viscosidade do óleo cru, prolongando o tempo de vida útil desses reservatórios. Do ponto de vista econômico, os biossurfactantes ainda não são capazes de competir com os surfactantes químicos, em decorrência do seu alto custo de produção. Porém, o uso de substratos alternativos pode contribuir para a redução de custos, uma vez que o meio de cultivo representa aproximadamente 30 % dos custos de produção. Neste trabalho, biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A em meio de cultura baseado em manipueira e melaço foi caracterizado quanto à estabilidade de emulsões formadas entre extratos livres de células e querosene. O efeito do pH, da temperatura e da salinidade sobre a estabilidade das emulsões, sobre a tensão superficial dos extratos e sobre a diluição micelar crítica foi também investigado. A concentração de biossurfactantes no meio de crescimento correspondeu a 15 vezes a concentração micelar crítica. A tensão superficial do meio foi reduzida de 45,2 mJ m⁻² para 24,4 mJ m⁻². Extratos dos biossurfactantes formaram emulsões estáveis em salinidade de até 15% de NaCl, em temperatura de até 55°C e em pH entre 6,0 e 10,0. A tensão superficial e a DMC não foram afetadas por essas variáveis.

Palavras-chave: ramnolipídeos; Resíduos agroindustriais; condições extremas.

4.1 INTRODUÇÃO

Um dos problemas enfrentados ainda hoje pelo setor petrolífero é o baixo aproveitamento dos reservatórios de petróleo. Em alguns casos, a mobilização do óleo é de apenas 30 a 50% do óleo retido (Lundquist *et al.*, 2001). A recuperação avançada do petróleo melhorada por microrganismos (MEOR) refere-se a um conjunto de técnicas que utilizam microrganismos ou seus metabólitos para aumentar a eficiência da recuperação do óleo nas rochas-reservatórios, sendo uma de suas abordagens a utilização de biossurfactantes. Esses compostos podem aumentar a produção de óleo por diminuir a tensão interfacial da interface óleo-rocha. A diminuição dessa tensão reduz as forças capilares que impedem o movimento do óleo através dos poros da rocha. Além disso, biossurfactantes podem reduzir a viscosidade do óleo cru, prolongando o tempo de vida útil dos reservatórios (Li *et al.*, 2002).

Biossurfactantes são um grupo de metabólitos secundários com propriedades ativas de superfície sintetizados por uma grande variedade de microrganismos. Esses metabólitos compreendem moléculas anfifílicas cujo domínio polar e hidrofóbico dependem da bactéria produtora e do substrato carbônico a ela fornecido (Banat, 1995).

Bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* são capazes de sintetizar biossurfactantes conhecidos como ramnolipídios, que estruturalmente são glicolipídios contendo ácidos graxos ligados a moléculas de ramnose (Desai e Banat, 1997; Nitschke *et al.*, 2005). Os ramnolipídios são considerados como a classe de biotensioativos mais promissores em termos de produção industrial, pelas suas características físico-químicas e biológicas distintas. Eles são geralmente atóxicos, biodegradáveis e têm a capacidade de estabilizar emulsões (Banat *et al.*, 2000) e diminuir a tensão superficial da água para 25 a 30 dina.cm⁻¹ (Lang e Wagner, 1987). Além disso, apresentam elevada estabilidade térmica e de pH, podendo ser utilizados em condições extremas. Alguns suportam concentrações de 10 % de NaCl, enquanto concentrações salinas de 2 a 3 % são suficientes para inativar surfactantes sintéticos convencionais (Bognolo, 1999).

Do ponto de vista econômico, os biossurfactantes ainda não são capazes de competir com os surfactantes químicos, em razão principalmente do seu alto custo (Banat *et al.*, 2000) associado a processos ineficientes de recuperação e purificação (Fox e Bala, 2000; Rocha *et al.*, 2006). Porém, o uso de substratos alternativos pode contribuir para a redução de custos, uma vez que o meio de cultivo representa aproximadamente 30 % do valor final do produto (Makkar e Cameotra, 1999). O

principal problema na utilização de resíduos em processos biotecnológicos envolve a seleção de um substrato que contenha um balanço correto de nutrientes que suportem tanto o crescimento celular quanto a produção do composto de interesse (Nistchke e Pastore, 2006).

Neste trabalho, biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A em meio de cultura baseado em manipueira e melão foi testado quanto à estabilidade de emulsões formadas entre extratos livres de células e querosene. O efeito do pH, da temperatura e da salinidade sobre a estabilidade das emulsões, sobre a tensão superficial dos extratos e sobre a diluição micelar crítica foi também investigado.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Microrganismo

O isolado *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A, previamente selecionado como produtor de biossurfactante entre os pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) do Departamento de Microbiologia (DMB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), foi o microrganismo utilizado neste estudo.

4.2.2 Meios de cultura

O isolado foi reativado em meio R2A (Reasoner e Geldreich, 1985) (Tabela 4.1), cujo pH foi ajustado para 7,2, seguindo-se a autoclavagem a 121°C por 15 minutos. O meio utilizado para produção de biossurfactante foi constituído de manipueira e melação, sendo o último adicionado em quantidade suficiente para se obter concentração final de 10% (p/v) (Tabela 4.1). O pH do meio foi ajustado para 6,8, seguindo-se a autoclavagem a 121°C por 15 minutos.

Tabela 4.1. Composição dos meios R2A e melação + manipueira

Meio R2A ¹		Melação + manipueira	
Componentes	Quantidades	Componentes	Quantidades
Extrato de levedura	0,50 g	Melação	100 g
Proteose peptona	0,50 g	Manipueira	500,00 mL
Casaminoácidos	0,50 g	Água	q.s.p. 1000 mL
Glicose	0,50 g		
Amido solúvel	0,50 g		
Piruvato de sódio	0,30 g		
K ₂ HPO ₄	0,30 g		
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,05 g		
Água	1000,00 mL		

¹ –Reasoner e Geldreich (1985)

O melação foi obtido na Companhia Agrícola Pontenovense – Usina Jatiboca, em Ponte Nova, Minas Gerais e armazenado em câmara fria a $\leq 8^{\circ}\text{C}$ até o momento da sua utilização, antes da qual passou por um processo de pré-tratamento visando à retirada de sólidos insolúveis. Este processo consistiu no ajuste do pH do melação para 3,0 com solução de H₂SO₄ a 2 mol L⁻¹. A solução permaneceu em repouso por 24 horas em temperatura ambiente. Após esse período, foi centrifugada a 5.000 g por 15 minutos. O

pH do sobrenadante foi ajustado para 6,8 com solução de NaOH a 2 mol L⁻¹ (Roukas, 1998).

A manipueira foi obtida em área de produção artesanal de polvilho de mandioca, na zona rural de Viçosa, Minas Gerais. O líquido de aspecto leitoso, resíduo da prensagem da mandioca, foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e armazenado nas mesmas condições descritas para o melaço até o momento da sua utilização, antes da qual também passou por um processo de pré-tratamento. A manipueira foi aquecida até a fervura, resfriada à temperatura ambiente e centrifugada a 9.400 g por 20 minutos, para a remoção do amido e de outros sólidos insolúveis (Nitschke *et al.*, 2004). O sobrenadante formado a partir desse processo consistiu na manipueira tratada que foi utilizada neste estudo.

O melaço e a manipueira foram submetidos à análise química para determinação dos macronutrientes P, K, Ca, Mg e N, do ferro e dos açúcares totais (Tabela 4.2). Os macronutrientes e o ferro foram determinados pelo Laboratório de Qualidade da Água do Departamento de Engenharia Agrícola e Ambiental da UFV. Os açúcares totais e redutores presentes no melaço foram determinados pelo método de Fehling (Gomes, 1996). Os açúcares totais da manipueira foram determinados pelo método fenol-sulfúrico (Daniels *et al.*, 1994) e os açúcares redutores pelo método colorimétrico DNS (Miller, 1959).

Tabela 4.2. Características físico-químicas da manipueira e do melaço utilizados neste trabalho, após o processo de pré-tratamento

Variáveis	Concentração (mg L ⁻¹)	
	Manipueira	Melaço
Sólidos totais	4.502	78.806
DQO	5.760	91.200
Açúcares totais	4.707,0	555.600
Açúcares redutores	3,5	161.000
Açúcares não-redutores	4.703,0	394.600
Nitrogênio total	210	628
Nitrato	4,5	415
Fósforo total	643	46,4
Potássio total	49	3833
Cálcio total	3,52	967
Magnésio total	8,12	322
Ferro total	N.D.	18,5
pH	4,56	3,75

N.D. – Não detectável pelo equipamento de leitura ou pela técnica de determinação.

4.2.3 Preparo do inóculo e condições de cultivo

O inóculo foi preparado a partir da adaptação da cultura ao meio melação e manipueira. Essa adaptação consistiu da transferência de uma alíquota da cultura previamente ativada em meio R2A, após centrifugação a 12.000 g por 15 minutos e ressuspensão em solução salina 0,85%, para frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 15 mL do meio de crescimento, por duas vezes consecutivas. O inóculo assim obtido foi transferido para frascos erlenmeyer de 1000 mL contendo 350 mL do meio de crescimento, de modo a se obter uma densidade óptica inicial a 600 nm equivalente a 0,100. Para cada uma das adaptações, assim como para a reativação dos microrganismos em R2A, o tempo de incubação foi de 14 horas sob temperatura de 30°C e agitação orbital de 200 rpm. As condições de cultivo durante a produção de biossurfactante foram as mesmas, porém o período de incubação foi de 72 horas. Após o cultivo, os meios foram centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, e o extrato livre de células foi submetido à caracterização físico-química e à determinação do consumo de nitrogênio e ferro ao longo do período de cultivo.

4.2.4 Propriedades físico-químicas dos biossurfactantes

4.2.4.1 Diluição micelar crítica (DMC) do extrato bacteriano livre de células

A DMC dos extratos livre de células contendo os biossurfactantes foi estimada pela medição da tensão superficial pelo método do anel de du Nouy, utilizando-se um tensiômetro Fisher Surface Tensiomat (Modelo 21, Pittsburgh, EUA). Diluições dos extratos foram preparadas em água ultra-pura. As condições de análise foram: volume médio da amostra de 7 mL, temperatura de 22 °C e pH entre 6,8 e 7,0.

A DMC foi estimada após a elaboração de gráficos de tensão superficial *versus* diluição do meio (Cooper et al., 1979).

4.2.4.2 Atividade de emulsificação e estabilidade da emulsão

O extrato da cultura bacteriana (2 mL), após remoção das células, foi misturado a 2 mL do querosene em um tubo de vidro (100 mm X 15 mm) vedado com Parafilm (American National Can TM). A mistura foi agitada por 2 minutos e deixada em repouso por 2 minutos, medindo-se a seguir o volume da emulsão formada. A estabilidade da emulsão foi avaliada a cada 6 h até 48 h após o início do ensaio. O índice de emulsificação foi determinado medindo-se a altura da camada emulsificada (cm), dividindo-se a mesma pela altura total do líquido e multiplicando-se o valor obtido por 100. A emulsão foi considerada estável se seu volume, 24 horas após a sua formação, correspondesse a 50% ou mais do volume original.

A emulsão obtida com o extrato livre de células contendo biossurfactante foi comparada à obtida com o surfactante sintético SDS, a uma concentração de 0,5% (p.v⁻¹) em água desionizada. A concentração de SDS foi escolhida por ser maior do que a sua CMC, estimada em 0,18% (Bodour e Maier, 1998).

4.2.4.3 Avaliação do efeito da salinidade, da temperatura e do pH na atividade dos biossurfactantes

Para se avaliar o efeito da temperatura sobre a estabilidade dos biossurfactantes, amostras dos extratos livres de células foram submetidas às temperaturas de 45, 55, 70 e 80°C por 24 horas. Após esse período, foram realizados ensaios de emulsificação, medidas de tensão superficial e estimativa da DMC. Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente (22°C ± 1°C).

O efeito do pH sobre a atividade do biossurfactante foi avaliado ajustando-se o pH do extrato livre de células contendo o biossurfactante **com solução de** para 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0. O efeito da salinidade foi determinado variando-se a concentração de NaCl para 1, 5, 10 e 15% (p/v). Os extratos com diferentes valores de pH e de salinidade permaneceram em repouso por pelo menos duas horas, antes da montagem dos ensaios para avaliação das emulsões. Para a determinação da DMC, esse período foi de pelo

menos 24 horas. Soluções preparadas com água ultra-pura, seguindo os valores de pH e as concentrações de NaCl testados, foram utilizadas nas diluições.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Tensão superficial e diluição micelar crítica (DMC)

A diluição micelar crítica (DMC) foi estimada pela relação entre a tensão superficial e as diluições do meio de cultura. A DMC corresponde à diluição na qual a tensão superficial começa a aumentar (Cooper *et al.*, 1979), em razão da desagregação dos biossurfactantes presentes como micelas. O valor da DMC encontrado para o isolado *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A, cultivado no meio a base de melaço e manipueira, foi correspondente à diluição de 15 vezes. Isso indica que possivelmente o biossurfactante estava presente no extrato livre de células a uma concentração aproximadamente 15 vezes acima da sua CMC.

Este resultado foi superior ao encontrado por Batista *et al.* (2006), que descreve a concentração do biossurfactante no meio de cultivo do isolado LBBMA 88A de 5 a 10 vezes acima da CMC. Entretanto, a produção de biossurfactante por esse isolado, em meio mineral acrescido de fontes de carbono hidrofóbicas (borra oleosa, dodecano e hexadecano), variou entre 100 e 10.000 vezes a CMC (Lima, 2003).

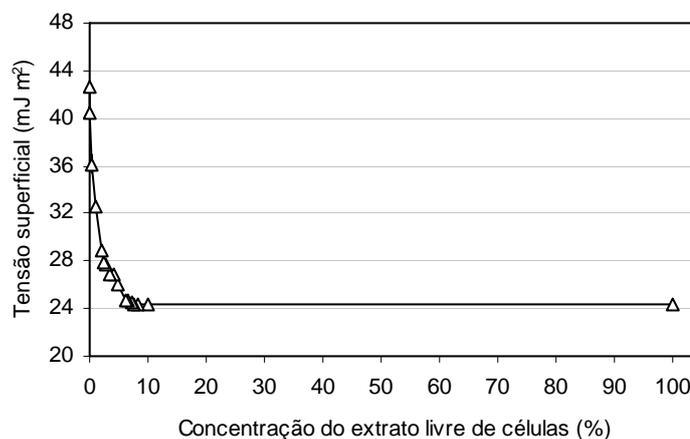


Figura 4.1. Variação da tensão superficial com a concentração do extrato livre de células. A curva foi plotada com a média de três repetições com as barras de erros representando \pm o desvio padrão.

4.3.2 Atividade de emulsificação e estabilidade da emulsão

O biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A presente no extrato livre de células foi capaz de formar emulsões estáveis com querosene (Figura 4.2), uma vez que seus volumes, 24 horas após a formação, ainda correspondiam a 50% ou mais do volume original (Willumsen e Karlson, 1997; Di Mambro, 2001).

O biossurfactante apresentou capacidade para estabilizar emulsões com querosene ao longo de 48 horas, o que pode ser comprovado pelo índice de emulsificação obtido (57,2 %) (Figura 4.2). Os resultados foram iguais aos encontrados por Batista (2006), quando o isolado LBBMA 88A foi cultivado em MM por 5 dias a 28° C e 150 rpm, e superiores aos obtidos por Abouseoud *et al.* (2008), que encontraram atividade de emulsificação de 54%, 24 horas após a formação da emulsão em querosene, quando utilizou óleo de oliva como fonte de carbono para *Pseudomonas fluorescens*. Além disso, o biossurfactante produzido por LBBMA 88A apresentou maior estabilidade de emulsão do que o surfactante sintético SDS[®] (Figura 4.2).

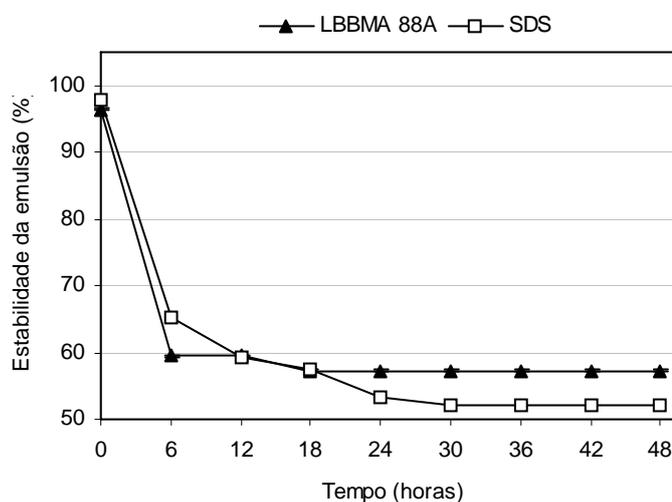


Figura 4.2. Atividade de emulsificação do isolado *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A, após cultivo em meio à base de melão e maní por 72 horas a 30°C e 200 rpm e do surfactante sintético SDS[®]. As curvas foram plotadas com médias de três repetições com as barras de erros representando \pm o desvio padrão.

4.3.3 Efeito da salinidade, da temperatura e do pH na atividade do biossurfactante

A estabilidade da emulsão formada pelo biossurfactante produzido pelo isolado *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A com querosene foi avaliada frente a variações de pH, salinidade e temperatura. Segundo Ilori *et al.* (2005), essas variáveis afetam a atividade de biossurfactantes. O padrão de comparação para se avaliar alterações na atividade do biossurfactante foi o comportamento apresentado por este nas condições de crescimento (30°C, pH entre 6,8 e 7,0 e sem adição de NaCl).

A estabilidade do biossurfactante quanto à variação da temperatura é mostrada na Figura 4.3. Para se avaliar esse efeito, os extratos foram expostos a temperaturas de 40, 55, 70 e 80°C.

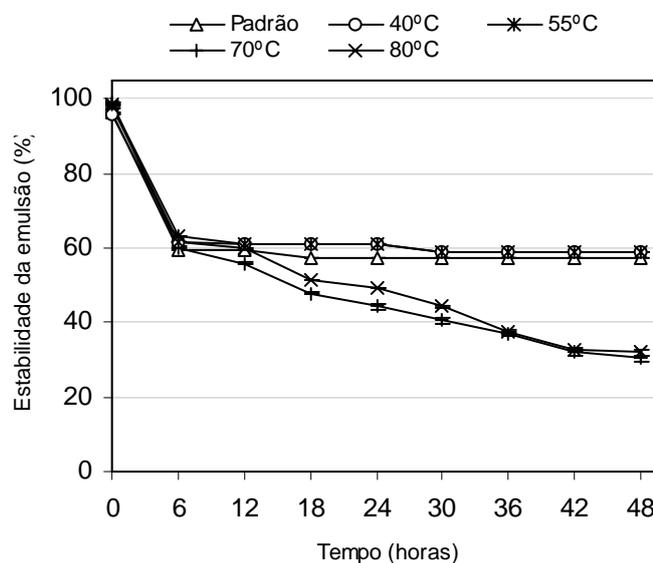


Figura 4.3. Efeito da temperatura sobre a atividade de emulsificação do biossurfactante produzido pelo isolado *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A, após cultivo em meio à base de melaço e manipueira, por 72 horas a 30°C e 200 rpm (padrão). As curvas foram plotadas com médias de três repetições com as barras de erros representando \pm o desvio padrão.

A emulsão formada pelo extrato livre de células contendo o biossurfactante se manteve estável quando submetida às temperaturas de 40 e 55°C alcançando índices de emulsificação de 58,7%, valor superior ao padrão que foi de 57,2%, correspondente ao extrato obtido do cultivo a 30°C. Os extratos mantidos a 70 e a 80°C apresentaram índices de emulsificação de 30,4 e 31,8%, respectivamente. Isso mostrou que a emulsão formada entre o querosene e o biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A é pouco estável sob temperaturas elevadas. Estudos devem ser realizados

para se averiguar o comportamento das emulsões em temperaturas entre 55 e 70°C, determinando-se o limite suportado pelo biossurfactante em questão a estabilidade da emulsão.

O efeito do tratamento térmico não demonstrou mudanças na atividade tensoativa do meio (Figura 4.4). A tensão superficial foi ligeiramente aumentada após a exposição do extrato a altas temperaturas, variando de 24,4 mJ m⁻² para valores próximos a 26,6 mJ m⁻² em todas as temperaturas testadas. A estimativa da DMC não foi alterada nem mesmo quando o extrato foi submetido à temperatura de 80°C, indicando que a temperatura na faixa estudada, não alterou as propriedades das moléculas de biossurfactante relacionadas à formação de micelas.

A estabilidade térmica dos ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* A41 também foi reportada por Thaniyavarn *et al*, (2006). Neste experimento as tensões superficiais dos biossurfactantes foram estáveis após incubação por 20 min a 121 °C ou 15 horas a 100 °C.

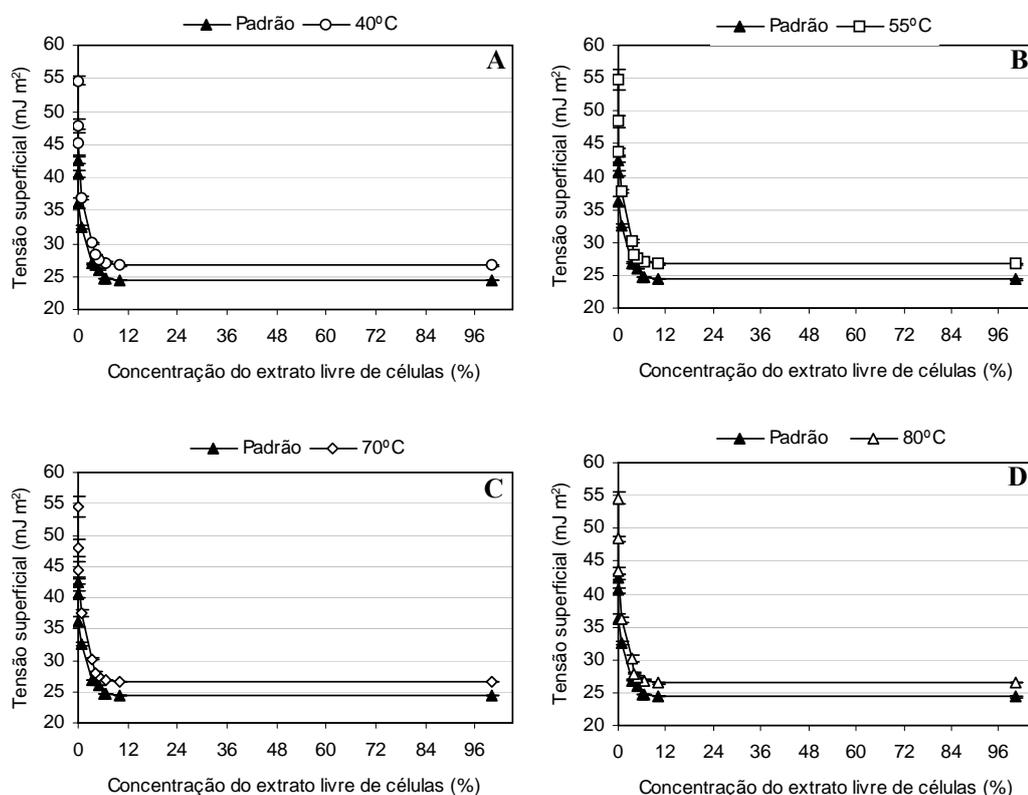


Figura 4.4. Efeito da temperatura sobre a atividade tensoativa do biossurfactante produzido pelo isolado *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A, em meio à base de melão e manipueira, após cultivo por 72 horas a 30°C e 200 rpm (padrão). (A) efeito da atividade tensoativa a 40°C; (B) efeito da atividade tensoativa a 55°C; (C) efeito da atividade tensoativa a 70°C e (D) efeito da atividade tensoativa a 80°C. As curvas foram plotadas com médias de três repetições com as barras de erros representando \pm o desvio padrão.

A estabilidade e a atividade tensoativa do biossurfactante foi avaliada também em relação à variação do pH, numa faixa de 4,0 a 10,0. Houve uma redução da estabilidade da emulsão em meio com pH 4,0 (Figura 4.5). Antunes (2007) observou que baixos valores de pH alteram as forças eletrostáticas envolvidas na formação das emulsões, o que promove floculação seguida da sedimentação dos flocos, que acarreta em instabilidade. O índice de emulsificação durante as 24 horas após o início do ensaio em pH 6,0 foi superior ao obtido nos meios com valores de pH abaixo (pH 4,0) ou acima desse valor (pH 8,0 e 10,0). O índice de emulsificação, após 30 horas, não foi afetado pelo valor de pH acima de 6,0.

A DMC do extrato livre de células não foi alterada pelo pH dos extratos (Figura 4.6). A tensão superficial foi um pouco maior nos extratos com pH alcalino (aproximadamente $26,7 \text{ mJ m}^{-2}$) do que a tensão encontrada nos extratos com pH 4,0 e 6,0 ($25,6 \text{ mJ m}^{-2}$). Conclui-se que o biossurfactante contido no extrato livre de células com valores de pH superiores a 6,8 formaram emulsões bastante estáveis com querosene. Além disso, a esse pH a atividade tensoativa do biossurfactante não sofreu alteração.

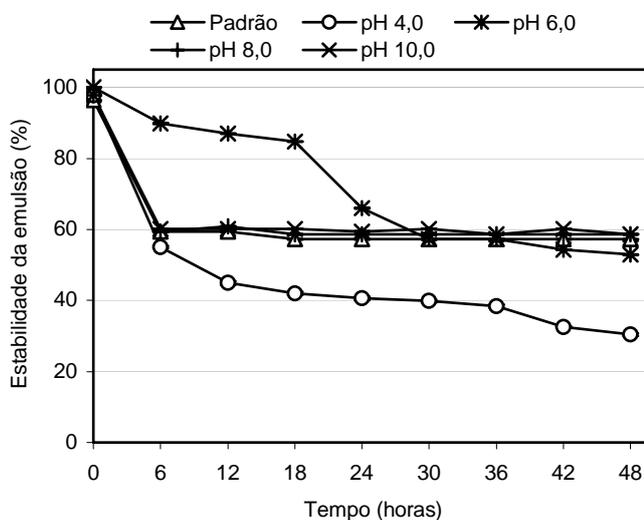


Figura 4.5. Efeito do pH sobre a estabilidade da emulsão do biossurfactante produzido pelo isolado *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A, após cultivo em meio à base de manipueira e melaço por 72 horas a 30°C e 200 rpm (padrão, pH = 6,8). As curvas foram plotadas com médias de três repetições com as barras de erros representando \pm o desvio padrão.

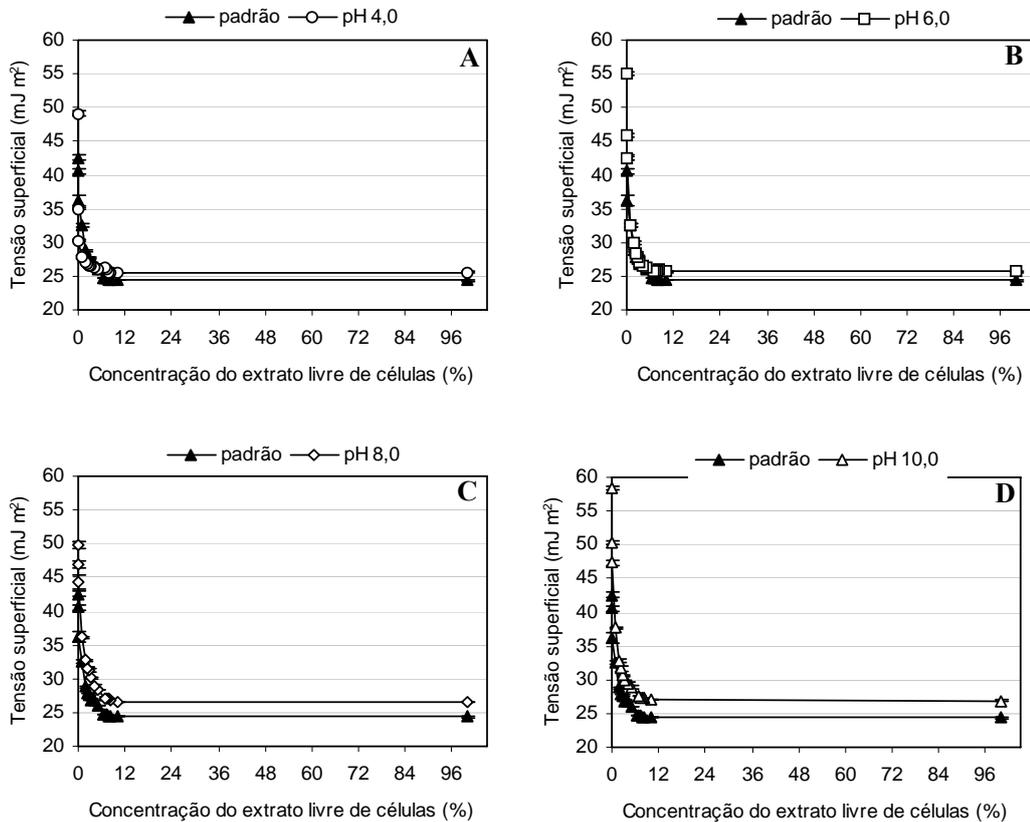


Figura 4.6. Efeito da variação do pH sobre a atividade tensoativa do biossurfactante produzido pelo isolado *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A, após cultivo por 72 horas a 30°C e 200 rpm (padrão, pH = 6,8). (A) efeito da atividade tensoativa com pH 4,0; (B) efeito da atividade tensoativa com pH 6,0; (C) efeito da atividade tensoativa com pH 8,0 e (D) efeito da atividade tensoativa com pH 10,0. As curvas foram plotadas com médias de três repetições com as barras de erros representando \pm o desvio padrão.

A concentração de NaCl não afetou a estabilidade das emulsões formadas com querosene (Figura 4.7). Quarenta e oito horas após a formação das emulsões, os valores eram superiores a 52,2% (Figura 4.7), o que indica a possibilidade de utilização dos biossurfactantes produzidos por *P. aeruginosa* LBBMA 88A em condições de alta concentração salina, a exemplo do que ocorre em operações de recuperação terciária do petróleo.

Os valores de tensão superficial sofreram um pequeno aumento quando NaCl foi adicionado ao extrato. As tensões variaram de $24,4 \text{ mJ m}^{-2}$, no padrão sem adição de NaCl, para valores de aproximadamente $26,8 \text{ mJ m}^{-2}$ quando o sal foi adicionado ao meio. Segundo Shaw (1970) os sais iônicos formam interações íon-dipolo com a água. Uma vez que essas interações são mais fortes que as interações entre sal e a fase gasosa, as moléculas desse soluto evitam a interface, causando um aumento da tensão superficial.

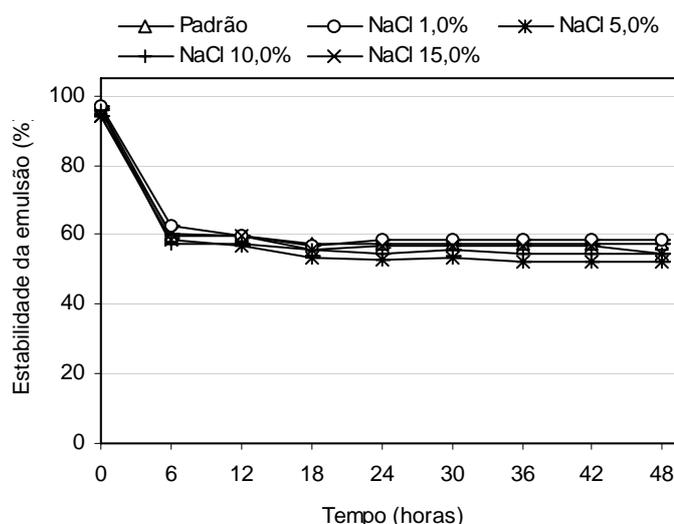


Figura 4.7. Efeito do aumento da salinidade sobre a estabilidade da emulsão do biossurfactante produzido pelo isolado *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A, após cultivo por 72 horas a 30°C e 200 rpm, sem adição de NaCl (padrão). As curvas foram plotadas com médias de três repetições com as barras de erros representando \pm o desvio padrão.

Quando NaCl se encontrava a uma concentração de 1,0% nenhuma alteração foi verificada na DMC do extrato. Porém, quando concentrações de 5,0% e 10,0% de NaCl no extrato livre de células foram avaliadas, uma diluição de 20 vezes foi necessária para que houvesse um aumento mais acentuado dos valores de tensão superficial. Já com concentrações de 15,0% a concentração do biossurfactante foi para valores 100 vezes acima da CMC, ou seja, o biossurfactante tornou-se mais eficiente em reduzir a tensão quando exposto a altas salinidades. Segundo Shaw (1970), a adição de sal a uma solução contendo surfactante iônico causa uma blindagem das forças de repulsão eletrostáticas existentes entre os grupos carregados na camada de Stern. Esse fenômeno favorece a micelização do surfactante e permite a formação de micelas maiores, aumentando sua CMC. Uma vez que o ramnolípídeo é biossurfactante aniônico, sua

interação com o íon Na^+ pode explicar a alta CMC aparente apresentada por essa molécula no tratamento com 15% de NaCl.

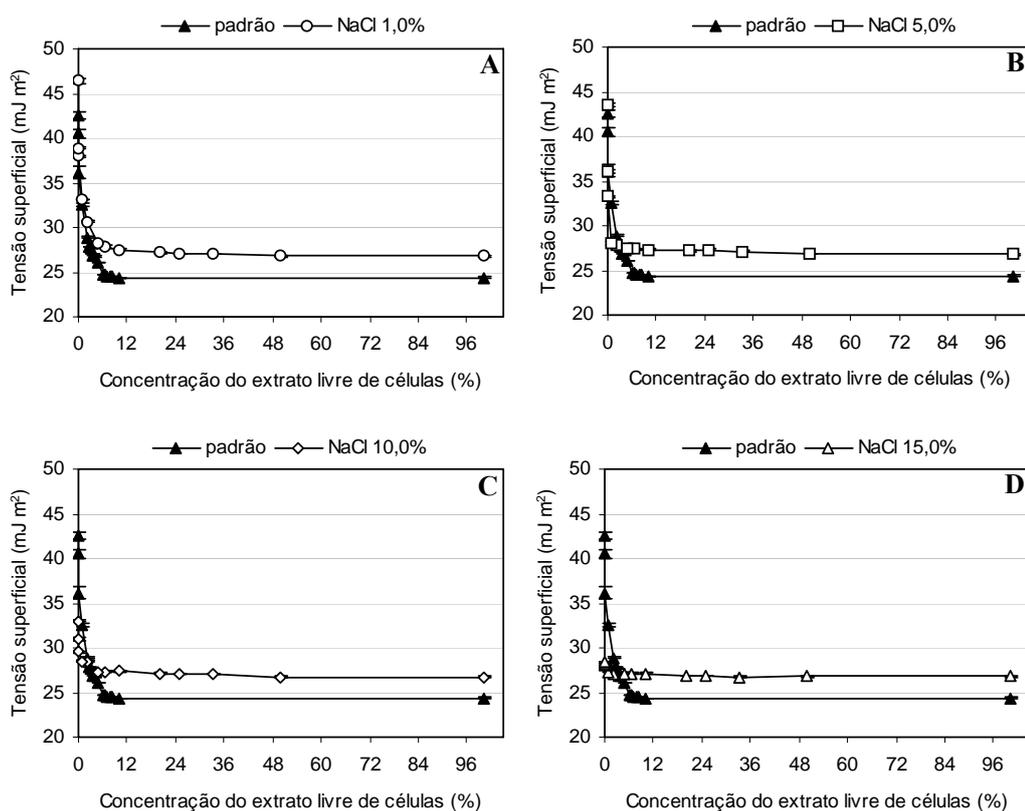


Figura 4.8. Efeito da salinidade sobre a atividade tensoativa do biossurfactante produzido pelo isolado *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A, após cultivo por 72 horas a 30°C e 200 rpm, sem adição de NaCl (padrão). (A) atividade tensoativa com adição de 1,0% de NaCl; (B) atividade tensoativa com adição de 5,0% de NaCl; (C) atividade tensoativa com adição de 10,0% de NaCl; (D) atividade tensoativa com adição de 15,0% de NaCl. As curvas foram plotadas com médias de três repetições com as barras de erros representando \pm o desvio padrão.

Os resultados encontrados apontam o biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A, nas condições de crescimento e produção testadas, como estável mesmo quando exposto a condições extremas **especificar melhor**.

Estudos envolvendo a caracterização de biossurfactantes quanto a estabilidade em condições extremas de pH, salinidade e temperatura, têm sido reportados na literatura por alguns autores (Nitschke e Pastore, 2006; Thaniyavarn *et al*, 2006). No

entanto, esses trabalhos têm apresentado resultados superficiais e inconclusivos a respeito das interações intermoleculares que conduzem a alterações na atividade dos biossurfactantes.

4.4. CONCLUSÕES

Meio baseado em melaço e manipueira alcançou resultados satisfatórios para a produção de biossurfactante pelo isolado *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A. O meio permitiu a produção de um ramnolípídeo com características desejáveis a aplicações ambientais, devido sua estabilidade quando em condições extremas de salinidades, temperaturas e pH.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUSEOUD, M., MAACHI, R., AMRANE, A., BOUDERGUA, S. & NABI, A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, **223**, 143-151.
- BANAT, I.M. (1995). Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresource Technology*, **51**, 1-12.
- BANAT, I.M., MAKKAR, R.S. & CAMEOTRA, S.S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbial Biotechnology*, **53**, 495-508.
- BATISTA, S.B. (2002). Bactérias de ambientes contaminados com petróleo ou derivados produtores de biossurfactantes e emulsificantes. 32f. **Dissertação (mestrado)** – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- BATISTA, S.B., MOUNTEER, A.H., AMORIM, F.R. & TÓTOLA, M.R. (2006). Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology*, **97**, 868-875.
- BODOUR, A.A., MILLER-MAIER, R.M. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, **32**, 273-280.
- BOGNOLO, G. (1999). Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **152**, 41-52.
- COOPER, D.G.; ZAJIC, J.E.; GERSON, D.F. (1979). Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **37(1)**, 4-10.
- DANIELS, L., HANSON, R., PHYLLIPS, J.A. (1994). **Chemical analysis**. In: Methods for General and Molecular Bacteriology. GERHARDT, P., MURRAY, R.G.E., WOOD, W.A. KRIEG, N.R. eds., American Society for Microbiology, Washington DC., 518-519.
- DESAI, J.D. & BANAT, I.M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, **61**, 47-64.
- DI MAMBRO, V.M. (2001). Desenvolvimento de formulações com superóxido dismutase: avaliação da estabilidade física das formulações e da atividade enzimática. **Dissertação de mestrado**. 138p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.
- FOX, S.L. & BALA, G.A. (2000). Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Bioresource Technology*, **75**, 235-240.
- GOMES, J.C. (1996). Análises de alimentos. Departamento de Tecnologia de alimentos/FUNARBE, Viçosa, UFV.

GUERRA-SANTOS, L., KAPPELI, O. & FIECHTER, A. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Applied and Environmental Microbiology*, **48(2)**, 301-305.

HARSHEY, R.M. (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Review Microbiology*, **57**, 249–273.

ILORI, M.O., AMOBI, C.J. & ODOCHA, A.C. (2005). Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. *Chemosphere*, **61**, 985-992.

LI, Q., KANG, C., WANG, H., LIU, C. & ZHANG, C. (2002). Application of microbial enhanced oil recovery technique to Daqing Oilfield. *Biochemical Engineering Journal*, **11**, 197-199.

LIMA, T.M.S. (2003). Produção de biossurfactantes visando o tratamento de borra oleosa. 69f. **Dissertação (mestrado)** – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

LUNDQUIST, A.D.; CHENEY, D.; POWELL, C.L.; O'NEILL, P.; NORTON, G.; VENEMAN, A.M.; EVANS, D.L.; MINETA, N.Y.; ABRAHAM, S.; ALLBAUGH, J.M.; WHITMAN, C.T.; BOLTEN, J.B.; DANIELS, M.E.; LINDSEY, L.B. E BARRALES, R. (2001) Energy for a New Century: Increasing Domestic Energy Production. *National energy policy report of the National Energy Policy Development Group*. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.

MAKKAR, R.S. & CAMEOTRA, S.S. (1999). Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. *Journal of Surfactants and Detergents*, **2(2)**, 237-241.

MILLER, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, **31**, 426-428.

MULLIGAN, C.N. & GIBBS, B.F. (1989). Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, **55(11)**, 3016-3019.

NITSCHKE, M. & PASTORE, G.M. (2006). Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology*, **97**, 336-341.

NITSCHKE, M., COSTA, S.G.V., HADDAD, R., GOLÇALVES, L.A.G., EBERLIN, M.N. & CONTIERO, J. (2005). Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. *Biotechnology Progress*, **21**, 1562-1566.

NITSCHKE, M., FERRAZ, C. & PASTORE, G.M. (2004). Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, **35**, 81-85.

OCHSNER, U.A. & REISER, J. (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. The Proceedings of the National Academy of Sciences, **92**, 6424-6428.

REASONER, D.J. & GELDREICH, E.E. (1985). A new medium for enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, **49**(1), 1-7.

ROCHA, M.V.P., OLIVEIRA, A.H.S., SOUZA, M.C.M. & GONÇALVES, R.L.B. (2006). Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. *World Journal Microbiology Biotechnology*, **22**, 1295-1299.

ROUKAS, T. (1998). Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. *Process Biochemistry*, **33**(8), 805-810.

SHAW, D.J. (1970). Introduction to colloid and surface chemistry. Editora Edgard Blucher Ltda. 181.

SOBERON-CHAVEZ, G., LEPINE, F. & DEZIEL, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbial Biotechnology*, **68**, 718-725.

THANIYAVARN, J., CHONGCHIN, A., WANITSUKSOMBUT, N., THANIYAVARN, S., PINPHANICHAKARN, P., LEEPIPATPIBOON, N., MORIKAWA, M. & KANAYA, S. (2006). Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* A41 using palm oil as carbon source. *The Journal of General and Applied Microbiology*, **52**, 215-222.

WAGNER, V.E., GILLIS, R.J. & IGLEWSKI, B.H. (2004). Transcriptome analysis of quorum-sensing regulation and virulence factor expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine*, **22**(Suppl.1), S15-S20.

WHITELEY, M., LEE K.M., & GREENBERG, E.P. (1999). Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 13904-13909.

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

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)