

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

MAIKE ROSSMANN

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E PROPRIEDADES
TENSOATIVAS DE BISSURFACTANTES 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 Sousa, a Fabiane de Mesquita Batista e ao Péricles Leonardo Fernandes, não só pela grande ajuda no desenvolvimento das atividades, mas também por todo carinho e incentivo.

Muito Obrigada.

AGRADECIMENTOS

A essa luz que guia, acalenta, acalma e permite que as coisas prossigam e tenham um final feliz. Afinal, se as coisas não estão bem é porque o fim ainda está por vir.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade em realizar o Mestrado e por auxiliarem no meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Prof. Marcos Rogério Tótola, pelos valiosos ensinamentos, que serão carregados por toda uma vida.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, cada um em sua área e com seus valores, que me mostraram das mais diversas formas esse mundo tão pequenininho e que me fizeram enxergar dos jeitos mais diferentes os vários momentos vividos nesses dois anos.

Aos amigos do BIOAGRO, que sempre, sempre, estiveram apoiando e permitindo que os experimentos fossem conduzidos a tempo e a hora e transformando o frio corredor do BIOAGRO em um lugar um pouco mais quentinho.

Aos companheiros do LBBMA, em especial aos estagiários que me auxiliaram, pessoas de grande dedicação não só a um experimento, mas a um objetivo.

À Cássia, pelo constante apoio nas atividades do laboratório.

Aos amigos que fiz aqui em Viçosa, cidade na qual os laços de amizade se tornam como de sangue, onde os sentimentos estão a todo o momento tomando conta das pessoas e dos lugares. A todos, fica a admiração, o agradecimento, o carinho e muitas saudades por tantos momentos vividos, que jamais se apagarão da minha memória e que estarão sempre no meu coração.

À amiga Fabi, por simplesmente tudo. Foi ela que me consolou quando precisei chorar, que sorriu comigo, que me apoiou quando questioneei algumas coisas, e que viveu e acreditou nos meus sonhos. A você, toda a minha admiração!

Ao meu fiel escudeiro, Paulo, ou melhor, meu fiel cavaleiro, a quem agradeço a paciência, a dedicação, o carinho, o amor e a companhia que não me faltaram.

Aos meus Pais, Esmar e Hildegard, que suportaram a distância e agüentaram a saudade, confiaram em mim e se orgulharam do caminho que tracei, e que mesmo de longe acompanharam a minha trajetória. Aos meus irmãos, Heiko e Harry, pessoas com quem posso contar a qualquer hora, e que me passaram muita segurança, sentimento importante durante todo esse tempo. A toda a minha família, avôs, tios, primos, todos. Amo vocês!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO GERAL	1
 <u>CAPITULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	
1.1 RECUPERAÇÃO DO ÓLEO E A MEOR (Microbially Enhanced Oil Recovery)	4
1.2 SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES	6
1.3 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	7
1.4 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES A PARTIR DE SUBSTRATOS ALTERNATIVOS	9
1.5 USOS E POTENCIALIDADES DA MANIPUEIRA E DO MELAÇO COMO SUBSTRATOS PARA USO EM PROCESSOS MICROBIANOS ..	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	19
2.1 INTRODUÇÃO	20
2.2 MATERIAL E METODOS	22
2.2.1 Isolados bacterianos	22
2.2.2 Meios de Cultura	22
2.2.3 Preparo do inóculo e condições de cultivo	25
2.2.4 Determinação da tensão superficial dos extratos bacterianos livres de células	26
2.2.5 Delineamento experimental e análises estatísticas	26
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
2.4 CONCLUSÕES	36
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
 <u>CAPITULO 3. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR ISOLADOS BACTERIANOS E CULTURAS MISTAS</u>	
RESUMO	43

3.1 INTRODUÇÃO	44
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	46
3.2.1 Isolados bacterianos e composição das culturas mistas	46
3.2.2 Meios de cultura	46
3.2.3 Preparo do inóculo e condições de cultivo	48
3.2.4 Determinação da tensão superficial dos extratos bacterianos livres de células	49
3.2.5 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	50
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.4 CONCLUSÕES	70
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
<u>CAPITULO 4.</u> ESTUDO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO PELO ISOLADO <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBBMA 88A EM MEIO COMPOSTO POR MELAÇO E MANIPUEIRA	
RESUMO	75
4.1 INTRODUÇÃO	76
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	78
4.2.1 Microrganismo	78
4.2.2 Meios de cultura	78
4.2.3 Preparo do inóculo e condições de cultivo	80
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	81
4.2.4.3 Efeito da salinidade, da temperatura e do pH sobre a 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 sobre a atividade do biossurfactante	85
4.4 CONCLUSÕES	93
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
CONCLUSÕES GERAIS	97

LISTA DE FIGURAS

- 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. **30**
- 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 melaço. As medidas de tensão superficial foram obtidas a cada 24 horas. O modelo foi plotado com médias de quatro repetições. **32**
- 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 % (p/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. **54**
- Figura 3.2.** Modelos de regressão obtidos para tensão superficial do meio não-inoculado, composto de manipueira a 50% (v/v) e de melaço em concentrações variando de 2% a 10 % (p/v). Tensão superficial do meio sem diluição (A) e diluído 10 vezes (B). **55**
- 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 manipueira a 50% (v/v) e de melaço em concentrações variando de 2% a 10 % (p/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. **57**
- 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* subsp. *spizizenii* LBBMA 283. O microrganismo foi **59**

inoculado em meio de cultura composto de manipueira a 50% (v/v) e de melão em concentrações variando de 2% a 10 % (p/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.

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 CM 1, 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 melão em concentrações variando de 2% a 10 % (p/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. **62**

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 CM 2, composta por *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A e *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283. Os microrganismos foram inoculados em meio de cultura composto de manipueira a 50% (v/v) e de melão em concentrações variando de 2% a 10 % (p/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. **63**

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 CM 3, composta por *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283. Os microrganismos foram inoculados em meio de cultura composto de manipueira a 50% (v/v) e de melão em concentrações variando de 2% a 10 % (p/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 **65**

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 melaço e nitrogênio; (D1) taxa respiratória em função de melaço e ferro; (D2) taxa respiratória em função de nitrogênio e ferro.

- 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 CM 4, composta por *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A, *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e *Bacillus subtilis* subsp. *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 % (p/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. **66**
- Figura 3.9.** Dendrograma representando a similaridade entre isolados/culturas mistas. **68**
- Figura 4.1.** Variação da tensão superficial do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBBMA 88A com a concentração do extrato livre de células. A curva foi plotada com a média de três repetições. As barras de erro representam ± o desvio-padrão. **83**
- Figura 4.2.** Atividade de emulsificação do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBBMA 88A, após cultivo em meio à base de melaço e manipueira por 72 horas a 30°C e 200 rpm e do surfactante sintético SDS[®]. As curvas foram plotadas com médias de três repetições. As barras de erro representam ± o desvio-padrão. **84**
- Figura 4.3.** Efeito da temperatura sobre a atividade de emulsificação do biossurfactante produzido por *P. 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. As barras de erro representam ± o desvio-padrão. **86**
- Figura 4.4.** Efeito da temperatura sobre a atividade tensoativa do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBBMA 88A, em meio à base de melaço 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. As barras de erro representam ± o desvio-padrão. **87**

- Figura 4.5.** Efeito do pH sobre a estabilidade da emulsão do biossurfactante produzido por *P. 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. As barras de erro representam \pm o desvio-padrão. **88**
- Figura 4.6.** Efeito da variação do pH sobre a atividade tensoativa do biossurfactante produzido por *P. 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. As barras de erro representam \pm o desvio-padrão. **89**
- Figura 4.7.** Efeito do aumento da salinidade sobre a estabilidade da emulsão do biossurfactante produzido por *P. 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. As barras de erro representam \pm o desvio-padrão. **90**
- Figura 4.8.** Efeito da salinidade sobre a atividade tensoativa do biossurfactante produzido por *P. 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. As barras de erro representam \pm o desvio-padrão. **91**

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1.	Identificação e origem dos isolados bacterianos produtores de biossurfactantes utilizados neste estudo	22
Tabela 2.2.	Composição dos meios R2A e meio mineral (MM)	23
Tabela 2.3.	Composição do meio mineral suplementado com melação e/ou manipueira	23
Tabela 2.4.	Características físico-químicas da manipueira e do melação após o pré-tratamento para retirada de sólidos insolúveis	25
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}	29
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 melação	31
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 melação. Os valores representam a média de quatro repetições	31
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 melação. As medidas de tensão superficial foram obtidas 72 e 168 horas após o início da incubação	33
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 melação. As medidas de tensão superficial foram obtidas 72 e 168 horas após o início da incubação. Os valores representam a média de oito repetições	33
Tabela 3.1.	Isolados bacterianos utilizados no estudo de otimização do meio de cultura para produção de biossurfactante e composição das culturas mistas (CM) obtidas a partir do agrupamento dos isolados	46
Tabela 3.2.	Características físico-químicas da manipueira e do melação após o pré-tratamento para retirada de sólidos insolúveis	48

Tabela 3.3.	Níveis de variação das variáveis independentes empregados no estudo de otimização de meio de cultura para produção de biossurfactante por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBBMA 88A, <i>Bacillus subtilis</i> LBBMA 155 e <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> LBBMA 283	50
Tabela 3.4.	Matriz do delineamento experimental com variáveis reais e codificadas	51
Tabela 3.5.	Equações estimadas, valores recomendados de melação (M), nitrogênio (N) e Ferro (Fe) e valores previstos pelo modelo (\hat{Y}) para os isolados bacterianos e para as culturas mistas estudadas	53
Tabela 4.1.	Composição dos meios R2A e melação + manipueira	78
Tabela 4.2.	Características físico-químicas da manipueira e do melação após o pré-tratamento para retirada de sólidos insolúveis	80

RESUMO

ROSSMANN, Maíke, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2008.
Otimização da produção e propriedades tensoativas de biossurfactantes em meios à base de melaço e manipueira. Orientador: Marcos Rogério Tótola. Co-orientadores: Arnaldo Chaer Borges e Hilário Cuqueto Mantovani.

A produção de biossurfactantes em escala industrial é usualmente limitada pelo alto custo dos componentes do meio para o cultivo dos microrganismos. A utilização de substratos agroindustriais como meio de cultura básico para a produção desses compostos tem sido sugerida como alternativa para viabilizar o processo. O objetivo deste trabalho foi o de estudar a produção e as propriedades tensoativas de biossurfactantes em meios de cultura à base de manipueira e melaço por isolados de bactérias previamente identificadas como produtoras de biossurfactantes. Os baixos valores de tensão superficial e os altos valores de Diluição Micelar Crítica (DMC) demonstraram que três isolados, *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A, *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283, destacaram-se como os melhores entre os dez selecionados para o estudo. Os meios de cultura para cada um dos isolados bacterianos selecionados e para culturas mistas contendo esses mesmos isolados foi otimizado usando-se a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) por meio do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). *P. aeruginosa* LBBMA 88A e a cultura mista composta pelos três isolados selecionados foram potencialmente os de maior interesse para a produção de biossurfactante, uma vez que foram os únicos cuja produção de biossurfactantes foi influenciada apenas pela concentração de melaço e que alcançaram valores de DMC de pelo menos 10 vezes. O surfactante produzido por *P.aeruginosa* LBBMA 88A formou emulsões consideradas estáveis com querosene. Temperaturas acima de 70°C e valores de pH 4,0 reduziram a viscosidade do meio de cultura desestabilizando as emulsões formadas entre soluções aquosas dos biossurfactantes e o querosene. Concentrações de NaCl acima de 10 g L⁻¹ alteraram a atividade tensoativa em razão da desestabilização das micelas presentes. O meio a base de melaço e manipueira alcançou resultados satisfatórios para a produção de surfactante pelos isolados testados com características desejáveis a aplicações ambientais, em especial a estabilidade em amplas faixas de salinidade, temperatura e pH.

ABSTRACT

ROSSMANN, Maíke, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2008.
Optimization of production and tensoactives properties of biosurfactants in means based molasses and manipueira. Adviser: Marcos Rogério Tótola. Co-Advisers: Arnaldo Chaer Borges and Hilário Cuqueto Mantovani.

The production of biosurfactants on an industrial scale is usually limited by the high cost of the media components for the microorganisms cultivation. The use of agroindustrial substrates as the basic culture mean for the production of these compounds has been suggested as an alternative to making the process. The objective was to study the production and the tensoatives properties of biosurfactants in culture medias based on manipueira and molasses by bacterial isolates previously identified as biosurfactants producer. The low values of surface tension and the high values of Critical Micellar Dilution (CMD) showed that three isolates, *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A, *Bacillus subtilis* LBBMA 155 and *B. subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283, stood out as the best among the ten selected for the study. The culture medias for each of the selected bacterial isolates and mixed cultures containing these same isolates was optimized using the Response Surface Methodology (RSM) through the Central Composite Rotational Design (CCRD). *P. aeruginosa* LBBMA 88A and the mixed culture composed by the three selected isolates were potentially the greater interest to the production of biosurfactant, since they were the only which the biosurfactants production was influenced only by the concentration of molasses and the only who reached values of DMC at least 10 times. The surfactant produced by *P. aeruginosa* LBBMA 88A formed emulsions considered stable with kerosene. Temperatures over 70°C and pH values of 4.0 reduced the viscosity of culture media destabilizing the emulsions formed between aqueous solutions of biosurfactants and kerosene. NaCl concentrations above 10 g L⁻¹ altered the tensoative activity because of estabilization of the present surfactant micelles. The media based on molasses and manipueira achieved satisfactory results for the production of surfactant by the tested isolates with desirable characteristics for environmental applications, particularly the stability in wide ranges of salinity, temperature and pH.

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 sua toxicidade (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 de petróleo (EOR), 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 constitui um conjunto de tecnologias 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 óleo-água de injeção, favorecendo com isso a recuperação do óleo (BANAT *et al.*, 2000).

Espécies de *Bacillus* e de *Pseudomonas* têm se destacado tanto como as produtoras de biossurfactantes mais utilizadas em pesquisas, como pelos resultados encontrados. *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 especial pela sua habilidade em produzir endósporos (GEORGIU *et al.*, 1992; McINERNEY *et al.*, 2005), forma mais efetiva para o transporte através dos poros da rocha-reservatório do que células vegetativas (JANG *et al.*, 1983), dentre outros fatores. Também o potencial de *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 à sua potencialidade em sustentar a produção de biossurfactantes.

O melaço é um subproduto da indústria de beneficiamento de cana-de-açúcar, sendo vendido a baixo custo para complementação nutricional de ração animal ou, em alguns casos, descartado como resíduo. Consiste de água, açúcar (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 nesse 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 sua 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 surfactante 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 *B. 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, 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 (Microbially 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. 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 no 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 (microbially enhanced oil recovery), é o de menor custo de implementação em larga escala, quando comparado com os métodos térmicos, químicos e de miscibilidade. A MEOR se baseia na utilização de microrganismos e/ou de seus metabólitos e, na última década, vários dos estudos voltados para a produção destes metabólitos em substratos de baixo custo tem contribuído para fazer com que esse método se torne economicamente viável (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 aplicáveis à MEOR destacam-se: (i) gases, como o CO₂ e o CH₄, que aumentam a pressão no reservatório e

diminuem a viscosidade do óleo; (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 glicolípídeos e lipopeptídeos, que reduzem a viscosidade do óleo e a tensão interfacial entre o óleo e a água de injeção (BRYANT, 1987; BANAT, 1995; McINERNEY *et al.*, 2005).

Os biossurfactantes são metabólitos ativos em superfície produzidos por diversos microrganismos. 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-fluido de injeção. As principais estratégias para a utilização destes compostos na recuperação do petróleo são três, a saber: (1) a adição de nutrientes selecionados para o reservatório em questão, para estimular o crescimento da microbiota local produtora de biossurfactantes; (2) a 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; (3) a produção de biossurfactantes em biorreatores, em escala industrial, seguida da adição desses compostos no reservatório juntamente com a água de injeção (BANAT, 1995). Experimentos desenvolvidos em laboratório (OKPOKWASILI e IBIENE, 2006) e em campo (LI *et al.*, 2002) têm 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 condições extremas de temperatura (40-70 °C), salinidade (20-100 g L⁻¹), 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. A porção apolar ou hidrofóbica é geralmente um hidrocarboneto (DESAI e BANAT, 1997).

Em função da presença desses dois grupos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir preferencialmente nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade. A formação de um filme molecular nas interfaces reduz a tensão nessa região, sendo essa 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, o que leva a um processo de produção ambientalmente danoso. Além disso, muitos surfactantes sintéticos apresentam baixa biodegradabilidade, o que limita seu uso em diversas aplicações industriais e ambientais (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002b).

A denominação biossurfactante 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 esses compostos deve-se ao 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 para os microrganismos produtores, a exemplo da promoção da motilidade, sinalização e diferenciação celular; emulsificação e solubilização de compostos insolúveis em água e atividade antibiótica, além de influírem na aderência a ou liberação das células de superfícies, na formação de biofilmes e no aumento da patogenicidade (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, de propriedades e de composição química, algumas características são comuns à maioria dos biossurfactantes. Algumas dessas características representam vantagens sobre surfactantes convencionais (BOGNOLO, 1999). Os biossurfactantes são considerados como: (i) mais eficientes e efetivos do que surfactantes convencionais, pois produzem menor tensão superficial quando em menores concentrações (COOPER e PADDOCK, 1984; BOGNOLO, 1999); (ii) mais estáveis quanto às variáveis 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 de cultura 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 BIOSURFACTANTES

A produção de biossurfactantes pelos microrganismos está intimamente ligada às condições ambientais e nutricionais fornecidas. Todos os fatores que influenciam o crescimento microbiano afetam também diretamente a produção de biossurfactantes (DESAI e BANAT, 1997; MUKHERJEE e DAS, 2005). Temperatura, pH, agitação e disponibilidade de oxigênio afetam a produção de biossurfactantes pelo seu efeito sobre 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), de nitrogênio (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002a; ILORI *et al.*, 2005; ABOUSEOUD *et al.*, 2007; 2008) e de 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.

Modificações da composição do meio de cultura podem causar alterações da estrutura dos biossurfactantes produzidos por um determinado microrganismo e, conseqüentemente, das suas propriedades. Como exemplo, mencionam-se as alterações das moléculas de biossurfactantes lipídicos produzidos por *Bacillus subtilis*, em função do tipo de carboidrato adicionado ao 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 desses compostos. Assim, está demonstrado que a máxima produção de ramnolipídeos 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 maximizada 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 do surfactante (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002a). Também para *Pseudomonas fluorescens* os melhores resultados na produção de surfactante 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 nutriente para se obter altas concentrações de biossurfactante.

A adição de sais de ferro também é mencionada quanto ao efeito significativo no 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 surfactante 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 $\mu\text{mol L}^{-1}$, aumento maior que os atribuídos a cepas geneticamente modificadas (WEI *et al.*, 2004). Para *Pseudomonas* sp., 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 DE BIOSSURFACTANTES A PARTIR DE SUBSTRATOS ALTERNATIVOS

O custo de produção é um dos principais fatores a ser considerado 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 renováveis de nutrientes. 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 surfactante 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 surfactante 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 *P. aeruginosa* LBI, o biossurfactante produzido é capaz de reduzir tensão superficial do meio para 26,9 mJ m^{-2} (NITSCHKE *et al.*, 2005). Meio de cultivo

suplementado com óleo de canola e glicose para a produção de surfactante 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 surfactante por *Bacillus* (NITSCHKE *et al.*, 2004; 2005). O processo de tratamento da manipueira já foi otimizado (BARROS *et al.*, 2007a) e a produção de biosurfactante testada em escala piloto (BARROS *et al.*, 2007b).

Entre outros substratos utilizados como fonte de carbono em meio de cultura para produção de surfactante por *P. aeruginosa* incluem-se o melaço, inclusive em combinação com água de maceração de milho, cuja principal função seria a de fornecer nitrogênio (PATEL e DESAI, 1997; RASHEDI *et al.*, 2005). Recentemente, estudos com *B. 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, demonstraram maiores produções de biosurfactantes com meios contendo melaço ou soro de queijo como fonte de carbono, sendo a produção máxima obtida no meio contendo entre 5,0 e 7,0 % (p/v) de melaço (JOSHI *et al.*, 2008). Suco de caju também foi relatado como sendo capaz de sustentar a produção de surfactantes por *Acinetobacter calcoaceticus* (ROCHA *et al.* 2006; 2007).

1.5 USOS E POTENCIALIDADES DA MANIPUEIRA E DO MELAÇO COMO SUBSTRATOS PARA USO EM PROCESSOS MICROBIANOS

A manipueira é o resíduo líquido gerado nas indústrias de processamento de mandioca. Contém altas concentrações de compostos orgânicos, notadamente carboidratos, o que a torna um poluente cujo tratamento é oneroso. A preocupação com esse resíduo origina-se do fato de que a produção da farinha de mandioca gera entre 267 a 419 litros desse resíduo para cada tonelada de raiz processada. Esse volume é extremamente elevado quando se considera o total gerado no processamento em farinhas e fecularias, 80% das 26,6 milhões de toneladas de mandioca produzidas no Brasil em 2006 (FAOSTAT-FAO, 2008). Quando esse resíduo é liberado diretamente em córregos e rios, o amido residual pode causar um rápido crescimento das bactérias, resultando em depleção de oxigênio e em efeitos perniciosos sobre a vida aquática (GOODLEY, 2004).

A disposição desse tipo de resíduo no ambiente tem resultado em freqüentes problemas de poluição ambiental. Atualmente, a valorização de resíduos por meio do seu aproveitamento em outras atividades tem sido estimulada, o que pode 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.

Manipueira tem sido descrita como 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 da mandioca (ARAGÃO e PONTE, 1995). Além disso, 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 *Aspergillus niger* em processo de produção de ácido cítrico, uma vez que a produção não difere significativamente da obtida com 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 usualmente vendido a preço baixo para uso em alimentação animal ou, em alguns casos, é descartado como resíduo. Ele 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, 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). Este subproduto pode ser utilizado também na produção de biopolímeros por *Sphingomonas capsulata* ATCC 14666, sendo a melhor produção obtida com melaço pré-tratado a 8% (BERWANGER *et al.*, 2007), ou ainda para ser adicionado em pequenas quantidades na preparação de carvão ativado a partir de bagaço de cana (GONÇALVES *et al.*, 2006).

Considerando a possível redução no custo da matéria prima utilizada no processo biotecnológico de produção de surfactantes, representado pelo aproveitamento de resíduos e subprodutos agroindustriais, 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 capacidade de produzirem biosurfactantes a partir de substratos baseados em manipueira e melaço. A otimização da composição do meio foi estudada para cada um dos isolados bacterianos, sendo o surfactante produzido por *P. aeruginosa* LBBMA 88A 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. Potencial 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.
- 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 melaço 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 melaço 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 as 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 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 ainda um fator que limita a escala do processo. Uma das alternativas sugeridas para se superar essa limitação é a de se utilizar substratos agroindustriais como meio de cultura básico para o cultivo dos microrganismos produtores de biossurfactantes. Neste trabalho, foi avaliada a produção de biossurfactante por três isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, seis isolados de *Bacillus subtilis* e um isolado de *Dietzia maris* em meios de cultura formulados a partir de substratos baseados em manipueira e melaço. Com exceção dos isolados *P. aeruginosa* LBBMA 47 e *D. maris* LBBMA 191, diferenças estatísticas não foram encontradas tanto para os dados de tensão superficial do extrato livre de células puro quanto para este diluído. Em todas as condições avaliadas, tensão superficial dos extratos livre de células ou diluídos 20 vezes, os menores valores encontrados foram respectivamente: 26,8 mJ m⁻² e 39,5 mJ m⁻² para *P. aeruginosa* LBBMA 88A; 28,3 mJ m⁻² e 39,6 mJ m⁻² para *B. subtilis* LBBMA 155 e 28,2 mJ m⁻² e 37,9 mJ m⁻² para *B. subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283.

Palavras-chave: Surfactante; resíduos agroindustriais; *Pseudomonas aeruginosa*; *Bacillus subtilis*; *Dietzia maris*.

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 surfactantes, 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 (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 de biossurfactantes 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), 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).

Este trabalho teve como objetivo selecionar isolados bacterianos com elevada capacidade de produção de biossurfactantes 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 previamente caracterizados como produtores de biossurfactantes por Batista (2002) e Lima (2003). Os isolados são pertencentes à 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 subtilis</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	<i>Dietzia maris</i>	Borra oleosa – RECAP ³
LBBMA 270	<i>Bacillus subtilis</i>	Amostra de água de injeção de Jazida
LBBMA 271	<i>Bacillus subtilis</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</i> subsp. <i>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 melaço; (iii) MM preparado em manipueira, em substituição à água e (iv) meio composto apenas de manipueira e

melaço, 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	1.000 mL	Água	1.000 mL

¹ Reasoner e Geldreich (1985)

² Bodour e Miller-Maier (1998)

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

MM + melaço		MM + manipueira		Melaço + 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 mL
Na ₂ HPO ₄	4,000 g	Na ₂ HPO ₄	4,000 g	Água	q.s.p. 1.000 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	1.000 mL	Manipueira	1.000 mL		

O melaço 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 melaço 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 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) (Tabela 2.4).

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).

Tabela 2.4. 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.

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 (BIO-RAD SmartSpec[™] 3000). Para cada uma das adaptações, assim como para a reativação dos microrganismos em R2A, a incubação foi de 14 horas

sob temperatura de 30°C, em agitador orbital a 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 incubação, elevado para 168 horas. O extrato contendo o biossurfactante produzido após o período de incubação foi centrifugado a 12.000 g (Jouan[®] MR-23i) por 15 minutos para retirada das células microbianas. Medidas de tensão superficial do extrato livre de células foram realizadas a cada 24 horas. As determinações de tensão em extratos diluídos em água desionizada foram obtidas com 72 e 168 horas de incubação.

A atividade metabólica microbiana 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 (BIO-RAD SmartSpec[™] 3000) 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 de incubação, constituindo as sub-parcelas.

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 se avaliar o efeito do fator “tempo” sobre a variável dependente.

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. Nesse meio, o biossurfactante produzido pelo isolado *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A promoveu a maior redução de tensão superficial, de 56,2 mJ m⁻² para 27,6 mJ m⁻² (Tabela 2.5).

Comparando-se os valores de tensão superficial obtidos nos meios Melaço + Manipueira e MM + Melaço, observou-se um comportamento diferenciado entre os isolados de *P. aeruginosa* e de *B. subtilis*. Enquanto a produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* foi mais elevada em Melaço + Manipueira, o inverso ocorreu com os isolados de *B. subtilis* (Tabela 2.5). Esse resultado indica a ocorrência de um padrão similar de resposta de isolados da mesma espécie aos tipos e concentrações de nutrientes para a produção de biossurfactantes. As diferenças entre os padrões de resposta das duas espécies refletem diferenças nas exigências nutricionais para a produção de biossurfactantes, com destaque para o suprimento de nitrogênio, ferro e manganês, elementos cuja concentração alteram significativamente a produção de biossurfactantes por essas duas espécies (MAKKAR e CAMEOTRA, 1998; 2002; ABOUSEOUD *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2008).

A formulação Melaço + Manipueira foi aquela em que o maior número de isolados – nove em um total de dez – promoveram redução da tensão superficial para valores abaixo de 40 mJ m⁻² (Tabela 2.5), sendo este o valor mínimo para o biossurfactante ser considerado eficiente (COOPER *et al.*, 1987). Esses resultados podem ser atribuídos à presença de minerais e açúcares 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 mJ m⁻² por sete dos

dez isolados, embora a redução da tensão por esses isolados não tenha sido destacadamente maior do que a obtida nos meios formulados à base de melão e manipueira (Tabela 2.5).

Em síntese, os dados na Tabela 2.5 confirmam a característica dos isolados de produzir biossurfactantes, sendo a formulação com Melão + 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 outros 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 de entressafras.

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

*- Tensão superficial dos meios não inoculados.

¹ *P. aeruginosa*; ² *B. subtilis*; ³ *D. maris*.

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 se considerar a ocorrência de produção de um biossurfactante eficiente. Contudo, esse isolado 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 como promissor, Melaço + Manipueira, propiciou um metabolismo respiratório intenso pelos isolados em estudo, com base nos dados de evolução de CO₂ (Figura 2.1). Dentre os isolados estudados, destacaram-se o *B. subtilis* LBBMA 272 e *P.aeruginosa* LBBMA 47 com maior e a menor atividade respiratória, respectivamente. O resultado é coerente com a menor redução da tensão superficial nesse meio de cultura pelo isolado *P.aeruginosa* LBBMA 47, comparativamente aos demais isolados da espécie (LBBMA 58 e LBBMA 88A) (Tabela 2.5). Ressalta-se ainda a ocorrência de dois grupos distintos de isolados de *B. subtilis* e *D. maris*, com maior atividade respiratória (> 1.000 μmol mL⁻¹ de CO₂) e um grupo composto pelos três isolados de *P.aeruginosa*, com menor atividade respiratória (< 800 μmol mL⁻¹ de CO₂) (Figura 2.1).

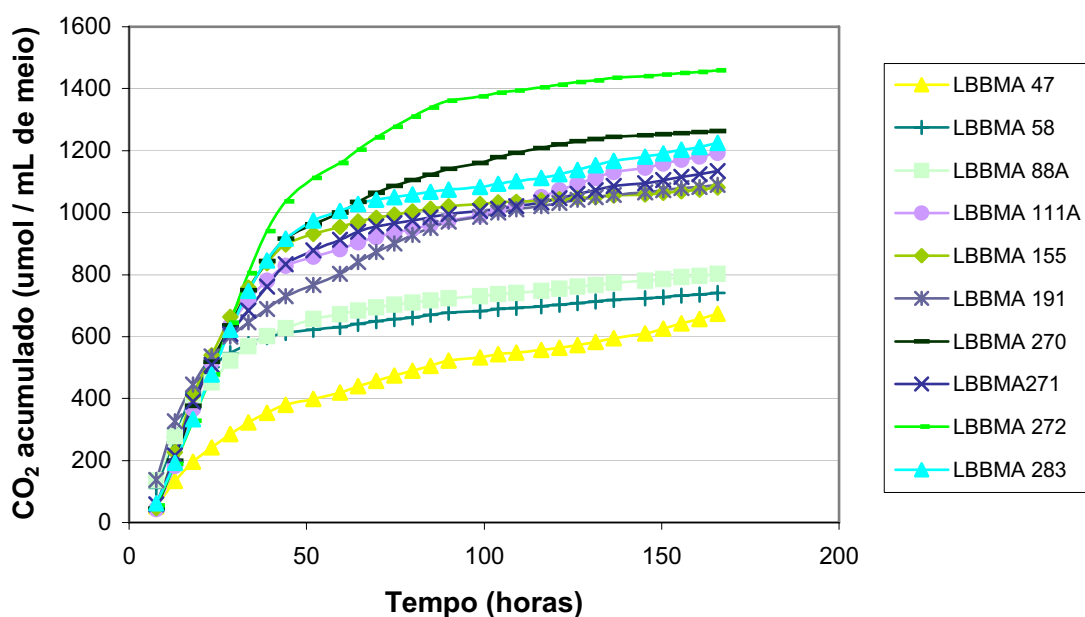


FIGURA 2.1 – Evolução de CO₂ dos isolados bacterianos LBBMA 47, LBBMA 58, LBBMA 88A, LBBMA 111A, LBBMA 155, LBBMA 191, LBBMA 270, LBBMA 271, LBBMA 272, LBBMA 283. Os isolados foram cultivados por 168 horas a 30°C em meio composto por melaço e manipueira. Os valores representam a média de quatro repetições.

A análise de variância (ANOVA) dos dados de tensão superficial dos extratos puros (Tabela 2.6) mostra que houve efeito ($p \leq 0,0001$) 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 dos tratamentos com LBBMA 47 e LBBMA 191, cujos 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 ($p \leq 0,0001$)

(Figura 2.2). Todos os demais isolados estudados apresentaram “tempo” como um fator não-significativo, ou seja, a tensão superficial não variou com o tempo.

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.

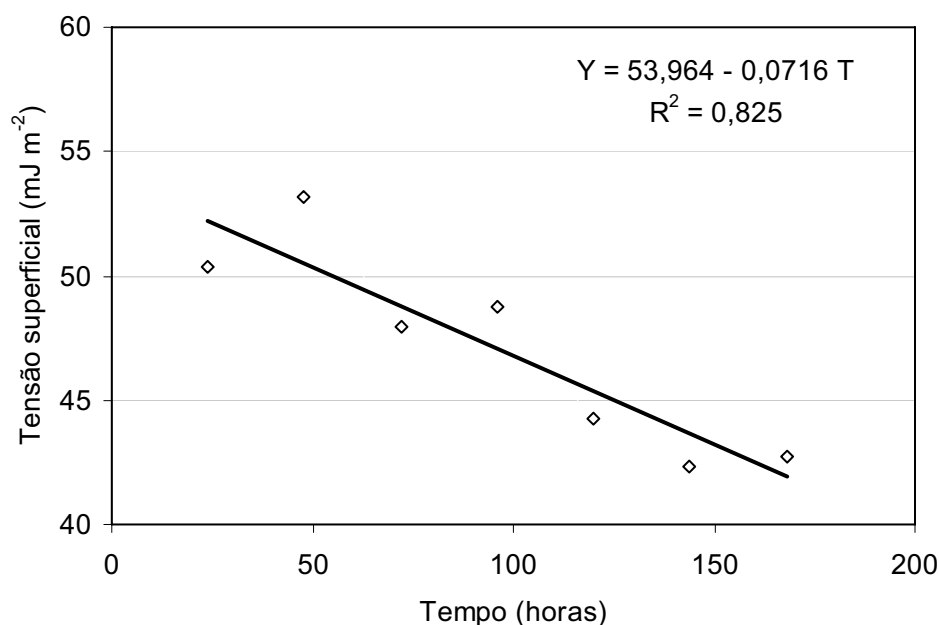


Figura 2.2 - Modelo de regressão para a tensão superficial do extrato livre de células do isolado LBBMA 191 em função do tempo. O isolado foi cultivado por 168 horas a 30°C e 200 rpm em meio composto por manipueira e melão. As medidas de tensão superficial foram obtidas a cada 24 horas. O modelo foi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

A tensão superficial dos extratos livres de células na diluição de 1:20 foi influenciada significativamente pelo fator “isolado” ($p \leq 0,0001$). As maiores médias foram novamente apresentadas pelos isolados LBBMA 47 (56,8 mJ m⁻²) e LBBMA 191 (59,1 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 2.8. 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			
Coeficiente de Variação = 4,5473		Média Geral = 44,038		

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 oito 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 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 desse extrato diluído. Em todas as condições avaliadas, os isolados de destaque foram: *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A; *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283. A escolha desses três isolados permitiu a avaliação de dois diferentes gêneros, *Bacillus* e *Pseudomonas*.

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), promoveram uma redução acentuada da tensão superficial e os sobrenadantes dos meios de cultura formaram emulsões estáveis com querosene (LIMA, 2003). Esta autora também descreveu o isolado LBBMA 155 como produtor de um surfactante cuja molécula não alterou suas características frente variações de pH, além de ter se mostrado estável a altas temperaturas e resistente à presença de até 5% de NaCl (LIMA, 2008).

Em outro trabalho também realizado por este grupo, 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. A autora 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 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 meios contendo fontes de carbono 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 por melaço e manipueira apresentou-se como uma alternativa que pode se mostrar com custo viável em processos de produção de biossurfactantes, já que sua composição suporta o crescimento microbiano e permite a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus* spp.

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

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 biossurfactantes 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.
- 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 biosurfactantes 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.
- 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.
- 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

Os microrganismos produtores de biossurfactantes mais estudados são os do grupo das bactérias, especialmente espécies dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*. Investimentos no cultivo misto de bactérias têm sido feitos, 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 subprodutos de agro-indústrias como componentes dos meios de cultura. Neste trabalho, meios de cultura foram formulados a partir de melaço e manipueira e otimizados para a produção de surfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A, *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e *Bacillus subtilis* subsp. *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. Nas culturas puras dos isolados LBBMA 155 e LBBMA 283 e nas culturas mistas LBBMA 88A + LBBMA 283 e LBBMA 155 + LBBMA 283, a produção foi influenciada tanto pela concentração de melaço quanto de nitrogênio e/ou ferro. Melaço e manipueira se mostraram como bons substratos para a produção de biossurfactantes pelos isolados testados e pelas culturas mistas formadas.

Palavras-chave: Surfactante; manipueira; melaço; *Pseudomonas*; *Bacillus*; DCCR.

3.1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos produtores de biossurfactantes mais estudados são os do grupo das bactérias, especialmente espécies dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*. O gênero *Bacillus* se destaca por já ser aplicado em processos de recuperação avançada do petróleo melhorada por microrganismos (MEOR) (BANAT, 1993; TABATABAEE *et al.*, 2002; SEPAHY *et al.*, 2005) em razão da sua habilidade em produzir endósporos, que são transportados mais efetivamente através dos poros da rocha-reservatório do que células vegetativas (JANG *et al.*, 1983; McINERNEY *et al.*, 2005), e pela sua capacidade de produzir biossurfactantes anaerobicamente sob condições de alta salinidade e temperatura (YAKIMOV *et al.*, 1997). *Pseudomonas* é também um gênero 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 biossurfactantes produzido por algumas espécies (LI *et al.*, 2002; DAS e MUKHERJEE, 2005; OKPOKWASILI e IBIENE, 2006).

A estratégia de se realizar o cultivo misto de bactérias produtoras de biossurfactantes oferece oportunidade para o desenvolvimento de processos economicamente viáveis, uma vez que os processos que utilizam culturas puras requerem maior custo operacional e maior investimento de capital (NADARAJAH *et al.*, 2002). Além disso, já se demonstrou que misturas de biossurfactantes aniônicos e catiônicos (BERGSTRÖM, 2001) ou iônicos e não-iônicos (ZHU e FENG, 2003) exibem comportamento sinérgico, como melhor solubilidade e maior eficiência, quando em proporções apropriadas.

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 (COOPER e PADDOCK, 1984; REISER *et al.*, 1998). Além disso, a estrutura química e as propriedades físicas podem ser modificadas por manipulações genéticas, biológicas ou químicas, possibilitando o desenvolvimento de novos produtos para necessidades específicas (MULLIGAN e GIBBS, 1989; MUKHERJEE *et al.*, 2006).

As características dos surfactantes produzidos por microrganismos em meio de cultura são influenciadas, entre outras coisas, pela natureza da fonte de carbono e pelas concentrações de nitrogênio (N), fósforo (P), magnésio (Mg), ferro (Fe) e manganês (Mn) (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 a base de manipueira - água residuária rica em amido de mandioca (NITSCHKE *et al.*, 2004; NITSCHKE e PASTORE, 2006) e de melão (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 representado pelo meio de cultura das bactérias, uma vez que são subprodutos pouco valorizados e 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* subsp. *spizizenii* LBBMA 283 a partir de substratos baseados em manipueira e melão, tanto em cultura pura como em cultura mista.

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 (CM) 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 subtilis</i>	Sedimento de fundo de mangue contaminado por petróleo – REDUC ²
LBBMA 283	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>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 foram 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 de cultura 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 melaço desejada (%). Este subproduto foi 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, seguido de autoclavagem a 121°C por 15 minutos.

O melaço 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 melaço 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 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 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) (Tabela 3.2).

No melão, 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).

Tabela 3.2. 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.

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 (BIO-RAD SmartSpec[™] 3000). Para cada uma das adaptações, assim como para a reativação dos microrganismos em R2A, a incubação foi de 14 horas sob temperatura de 30°C em agitador orbital a 200 rpm (New Brunswick Scientific, Edison, NJ-USA, Modelo C25KC incubator SHAKER, Classic series). As condições de cultivo durante a produção de biossurfactante foram as mesmas, excetuando-se o período de incubação, elevado para 72 horas. 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 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 (BIO-RAD SmartSpec[™] 3000) 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. Os frascos foram incubados estaticamente a 30°C, durante 30 horas. O gás de arraste, composto de ar atmosférico, foi injetado em intervalos de 4 horas.

3.2.4 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 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* subsp. *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

Ensaio	Variáveis codificadas			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 = melaço %; 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 equações de regressão, correspondentes às variáveis-resposta referentes à tensão superficial do extrato livre de células, puro ou diluído 10 e 100 vezes, e à taxa respiratória, expressam as condições idealizadas para a 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 a influenciar ($p < 0,002$) a tensão superficial dos extratos livres de células, puros ou diluídos, e a taxa respiratória. 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 ocorre em razão da adição de solutos a um líquido alterar a sua tensão superficial. Nesse caso, a redução da tensão é atribuída 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).

Os valores de tensão superficial do extrato livre de células diluído 10 vezes foram expressivamente reduzidos com o aumento da concentração de melaço no meio de cultura (Figura 3.1 B), porém 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 melação (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: ml m⁻²; Taxa respiratória: μmol mL⁻¹ h⁻¹ de CO₂

O aumento da concentração de melaço no meio utilizado para o crescimento microbiano reduziu de forma linear 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 melaço sobre a tensão superficial, uma vez que nessa diluição o resíduo não mais exerce tal influência (Dado não-mostrado).

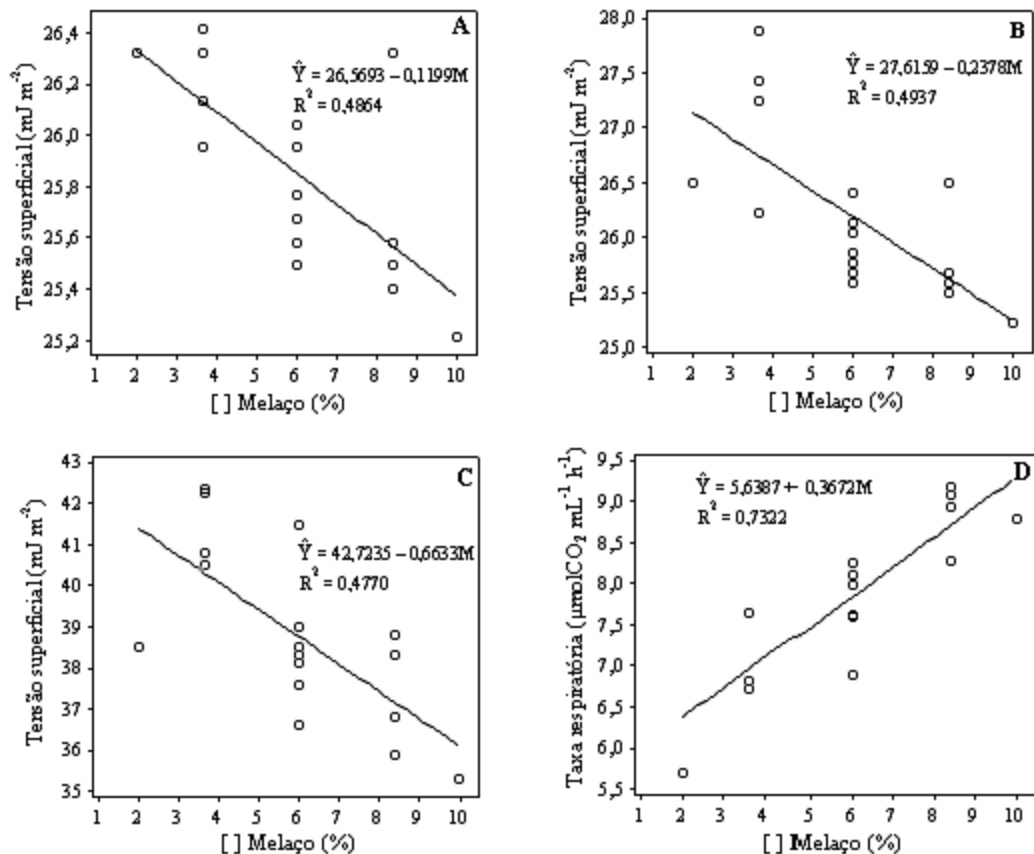


Figura 3.1. Modelos de regressão obtidos para a tensão superficial do extrato livre de células puro e diluído e para a taxa respiratória de *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A. O microrganismo foi inoculado em meio de cultura composto de manipueira a 50% (v/v) e de melaço em concentrações variando de 2% a 10 % (p/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.

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 melaço sobre a tensão superficial e a

concentração de surfactantes está abaixo da CMC. A relação inversa mostra que a maior produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* LBBMA 88A foi obtida quando se aumentou a concentração de melação no meio de cultura, até o valor-limite estudado (10% p/v).

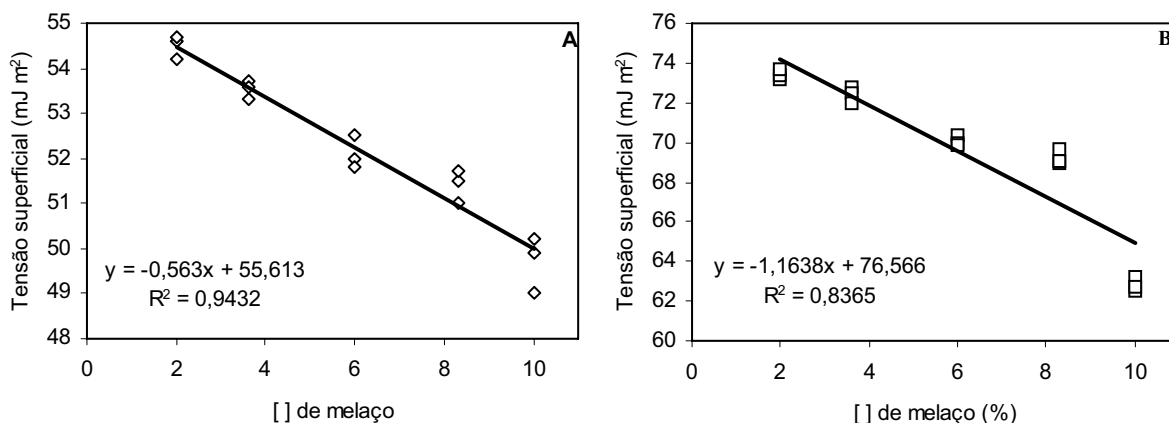


Figura 3.2. Modelos de regressão obtidos para tensão superficial do meio não-inoculado, composto de manípueira a 50% (v/v) e de melação em concentrações variando de 2% a 10 % (p/v). Tensão superficial do meio sem diluição (A) e diluído 10 vezes (B).

O aumento da concentração de melação 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, uma vez que a produção de biossurfactante acompanhou essa mesma tendência - maior produção, observada pelos menores valores de tensão, em maiores concentrações de melação. Essa possibilidade se faz aceita, pois a produção de surfactantes por *P. aeruginosa* é regulada por um mecanismo de *quorum sensing*, o sistema *rhl* (KOCH *et al.*, 1989; PEARSON *et al.*, 1997).

A presença de nitrogênio no meio de cultura não foi determinante para produção de surfactante pelo isolado *P. aeruginosa* LBBMA 88A, uma vez que esse fator no modelo não se mostrou significativo (Tabela 3.5). Isolados desse gênero tem a produção de biossurfactantes estimulada pela escassez de nitrogênio no meio (GUERRA SANTOS *et al.*, 1984; MULLIGAN e GIBBS, 1989; SOBERON-CHAVEZ *et al.*, 2005). Possivelmente, a predominância do nitrato no melação interferiu na resposta, pois a assimilação do nitrogênio nessa forma é consideravelmente lenta simulando uma condição de escassez, mesmo em concentrações mais elevadas. A lenta assimilação do

nitrato tem sido atribuída à necessidade de redução a amônio antes da assimilação (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1986). Os valores de relação C:N entre 16:1 e 18:1 são recomendados para se obter maiores produções de ramnolipídeos (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1986). Contudo, mesmo com a relação C:N em meio contendo melaço a 10% próxima a 31:1, constatou-se a redução na tensão superficial e a permanência dos valores de tensão após diluição do extrato livre de células de 10 vezes (Figura 3.1 B), fatos que asseguram a presença de biossurfactante no meio.

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 melaço no meio de cultura ($p \leq 0,037$). O menor valor de tensão superficial do extrato puro estimado pelo modelo foi de $24,1 \text{ mJ m}^{-2}$ (Figura 3.3 A), para o meio com 2% de melaço. A maior produção de biossurfactantes no meio contendo menor concentração de melaço está confirmada pelos dados de tensão superficial nos extratos diluídos (Figuras 3.3. B e 3.3. C), uma vez que eles demonstram o aumento da tensão superficial como função do aumento da concentração de melaço.

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 melaço no meio de cultura (Tabela 3.5 e Figura 3.3 D). Logo, o aumento na concentração de melaço 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 similar ao já observado durante o cultivo desse isolado em condições de anaerobiose em meio com concentração de glicose de 6% (p/v) (Fernandes, 2007) (dados não-publicados), quando se observou inibição do crescimento e da produção de biossurfactantes. A observada inibição da produção de biossurfactantes por *Bacillus* em meio de cultura contendo 9% de melaço também foi descrita 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 melaço, pode nesse caso não significar necessariamente maior taxa de crescimento ou maior concentração de células no meio, como descrito para *P. aeruginosa* LBBMA 88A. Esse resultado pode ser atribuído ao fato da atividade respiratória de microrganismos poder ser influenciada pelo estado metabólico da célula e ser intensificada sob condições de estresse (MOAT *et al.*, 2002).

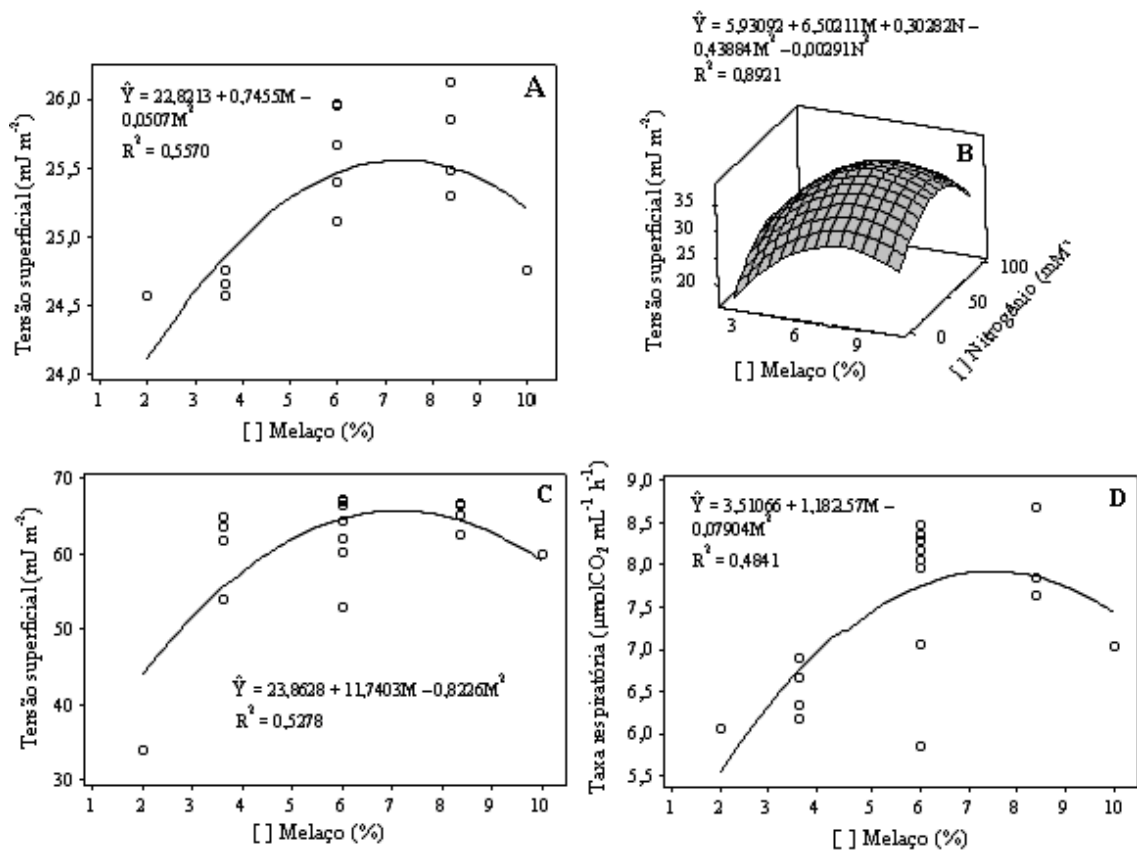


Figura 3.3. Modelos de regressão obtidos para a tensão superficial do extrato livre de células puro e diluído e para a taxa respiratória de *Bacillus subtilis* LBBMA 155. O microrganismo foi inoculado em meio de cultura composto de manipueira a 50% (v/v) e de melação em concentrações variando de 2% a 10% (p/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 demonstraram a influência da concentração de nitrogênio sobre a concentração de biossurfactante produzido no meio (Figura 3.3B). No extrato livre de células 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 pela manipueira e pelo melação foi suficiente para suprir a demanda do elemento para o crescimento microbiano e a produção de biossurfactantes. Assim como observado em *P.aeruginosa* LBBMA

88A, o estímulo à produção de biossurfactantes por *B. subtilis* LBBMA 155 pode estar associado a uma condição de limitação de nitrogênio. A produção de biossurfactantes por essa espécie e nessas condições já foi descrita por Davis *et al.* (1999).

O modelo de regressão baseado na diluição de 100 vezes do extrato livre de células foi significativo para o fator concentração de melão (Figura 3.3. C), e não-significativo para os fatores concentração de nitrogênio e concentração de ferro. Esses dados representam de forma mais adequada a concentração de biossurfactantes nos diferentes tratamentos. Isso se deve em razão dessa diluição não sofrer influência da formação de micelas. De acordo com o apresentado na Figura 3.3 C conclui-se, portanto, que a produção de biossurfactantes por *B. subtilis* LBBMA 155 é maior no meio de cultura com 2% de melão 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 de *B. subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283, em resposta a variações nas concentrações de melão, 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 ($p \leq 0,022$). O menor valor de tensão superficial estimado ($24,2 \text{ mJ m}^{-2}$) foi obtido no meio contendo 2% de melão, 55 mmol L^{-1} de nitrogênio e sem fonte adicional de ferro (Tabela 3.5). Assim como o observado para *B. subtilis* LBBMA 155, o aumento na concentração de melão 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 melão acima do mínimo utilizado neste estudo (2% p/v) não propicia menores valores de tensão superficial pelo *B. subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283.

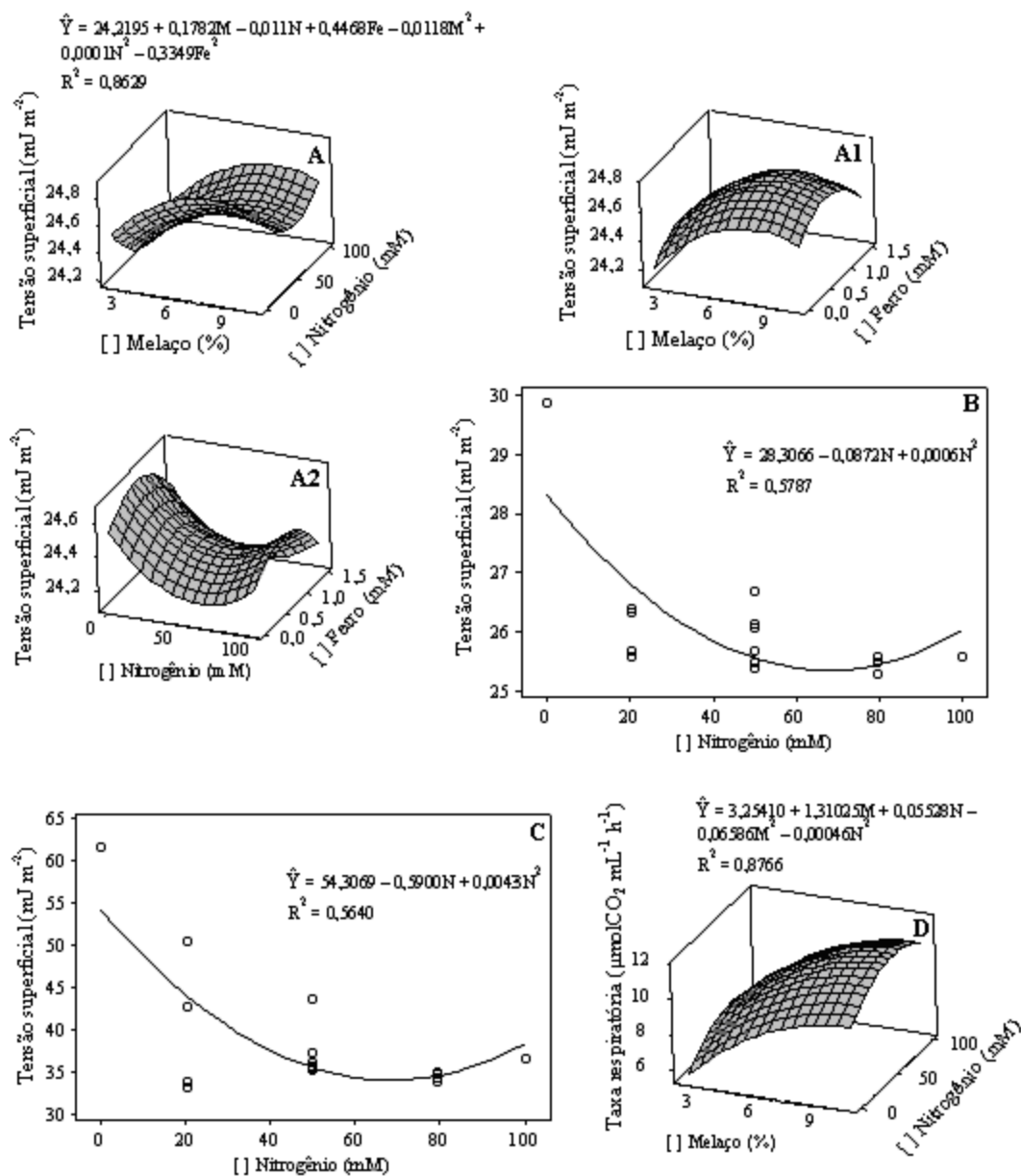


Figura 3.4. Modelos de regressão obtidos para a tensão superficial do extrato livre de células puro e diluído e para a taxa respiratória de *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283. O microrganismo foi inoculado em meio de cultura composto de manipueira a 50% (v/v) e de melaço em concentrações variando de 2% a 10% (p/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 melaço e nitrogênio; (A1) tensão superficial do extrato livre de células puro em função de melaço 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 livres de células diluídos não foi influenciada pela concentração de melão do meio de crescimento (Figuras 3.4 B e 3.4 C). Os valores de tensão superficial do extrato diluído 100 vezes (Figura 3.4 C) demonstrou que a produção de biossurfactantes por esse isolado foi influenciada pela concentração de nitrogênio do 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 $0,12 \text{ g L}^{-1}$, valor inferior ao geralmente utilizado para essa espécie, $0,5 \text{ g L}^{-1}$ (SEPAHY *et al.*, 2005; RAMMANI *et al.*, 2005). A resposta do isolado *B. subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283 à concentração de nitrogênio no meio de cultura foi inversa a apresentada pelo *B. subtilis* LBBMA 155. Essa diferença não é inesperada, uma vez que trabalhos de outros autores têm reportado tanto aumento (DAVIS *et al.*, 1999) quanto redução do crescimento e do rendimento da produção de biossurfactantes por membros do gênero *Bacillus* (MAKKAR e CAMEOTRA, 1997; 1998; DAS e MUKHERJEE, 2007) em resposta à deficiência de nitrogênio no meio de crescimento.

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* subsp. *spizizenii* LBBMA 283, embora a concentração fornecida pelo meio contendo melão a 2% ser de aproximadamente $0,02 \text{ mmol L}^{-1}$.

A ausência de resposta dos isolados de *Bacillus* à concentração de ferro no meio de cultura difere dos padrões já descritos. Wei *et al.* (2004) reportaram que a adição de 4 mmol L^{-1} de Fe^{2+} 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 os autores, o mecanismo do aumento da produção de surfactina associado à concentração de ferro ainda não se encontra completamente elucidado. A necessidade extra de ferro pode estar relacionada ao efeito quelante da surfactina sobre esses íons, o que levaria à redução na biodisponibilidade do elemento.

Os dois isolados em estudo, *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283, apresentaram menor requerimento de fonte de carbono

(melaço) para a máxima produção de biossurfactantes do que *P. aeruginosa* LBBMA 88A (Figura 3.1).

A tensão superficial dos extratos livres de células da cultura mista 1 (CM 1), composta por *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). CM 1 produziu biossurfactantes em meio de cultura adicionado de melaço e manípueira, os quais foram capazes de reduzir a tensão superficial dos extratos não-purificados para valores entre $26,7 \text{ mJ m}^{-2}$ e $28,1 \text{ mJ m}^{-2}$ (Tabela 3.5 e Figura 3.5). A diluição do extrato em 10 vezes causou uma pequena elevação da tensão superficial, a qual foi atribuída também à redução da concentração de solutos no meio, como já discutido para LBBMA 88A.

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

A resposta da CM 1 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 surfactantes por *P. aeruginosa* LBBMA 88A foi estimulada pelo aumento da concentração de melaço (Figura 3.1 C), enquanto que esse aumento resultou em menor produção de surfactantes por *B. subtilis* LBBMA 155 (Figuras 3.3 C). O valor de tensão superficial do extrato diluído 100 vezes ($40,8 \text{ mJ m}^{-2}$) (Figura 3.5 C) é similar ao dos extratos de mesma diluição de *P. aeruginosa* LBBMA 88A (Figura 3.1 C), mas inferior aos extratos dos meios inoculados com *B. subtilis* LBBMA 155 contendo melaço em concentração acima de 2% (Figura 3.3 C). Especula-se assim, que nos meios com maior concentração de carbono inoculados com a CM 1, *P. aeruginosa* LBBMA 88A tenha sido a principal responsável pela produção de biossurfactantes.

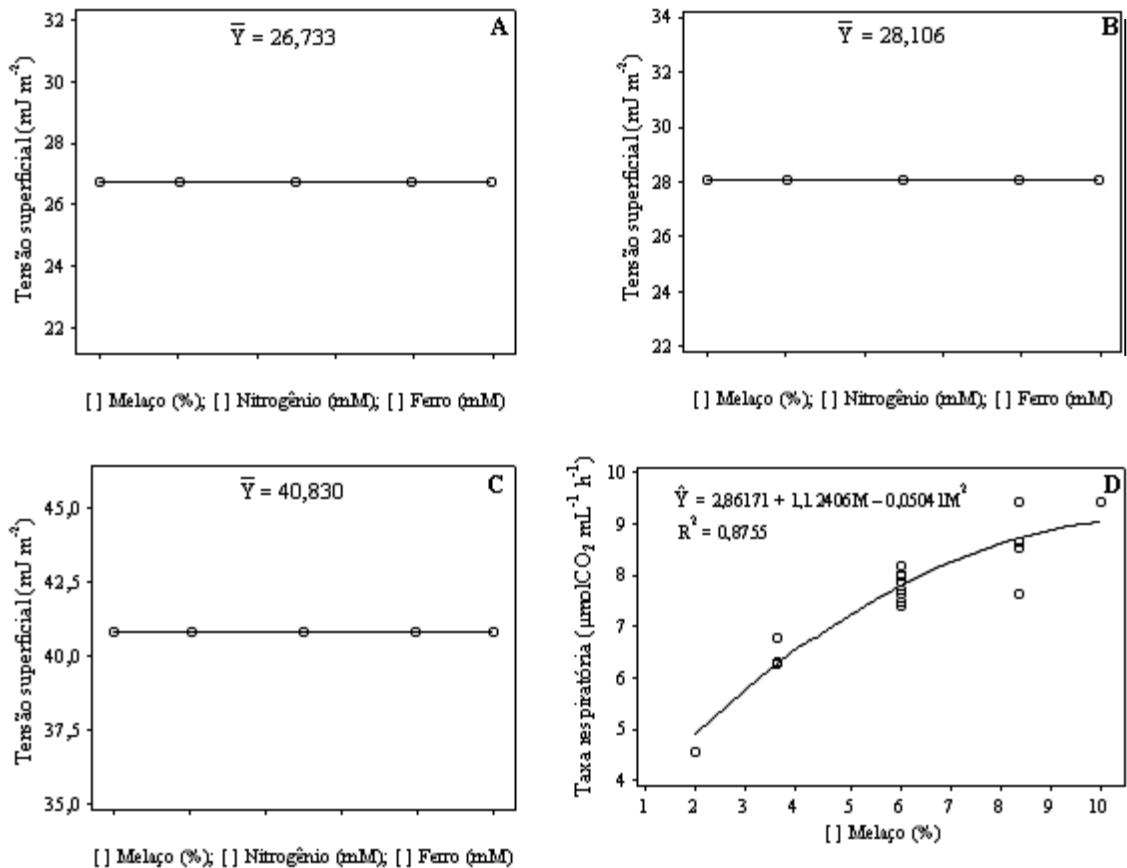


Figura 3.5. Modelos de regressão obtidos para a tensão superficial do extrato livre de células puro e diluído e para a taxa respiratória da cultura mista CM 1, composta por *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A e *Bacillus subtilis* LBBMA 155. Os microrganismos foram inoculados em meio de cultura composto de maniveira a 50% (v/v) e de melaço em concentrações variando de 2% a 10 % (p/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 por *P. aeruginosa* LBBMA 88A e *B. subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283, foram influenciadas pela concentração de melaço no meio de cultura ($p \leq 0,022$). A tensão superficial do extrato puro diminuiu linearmente com o aumento da concentração de melaço no meio (Figura 3.6 A).

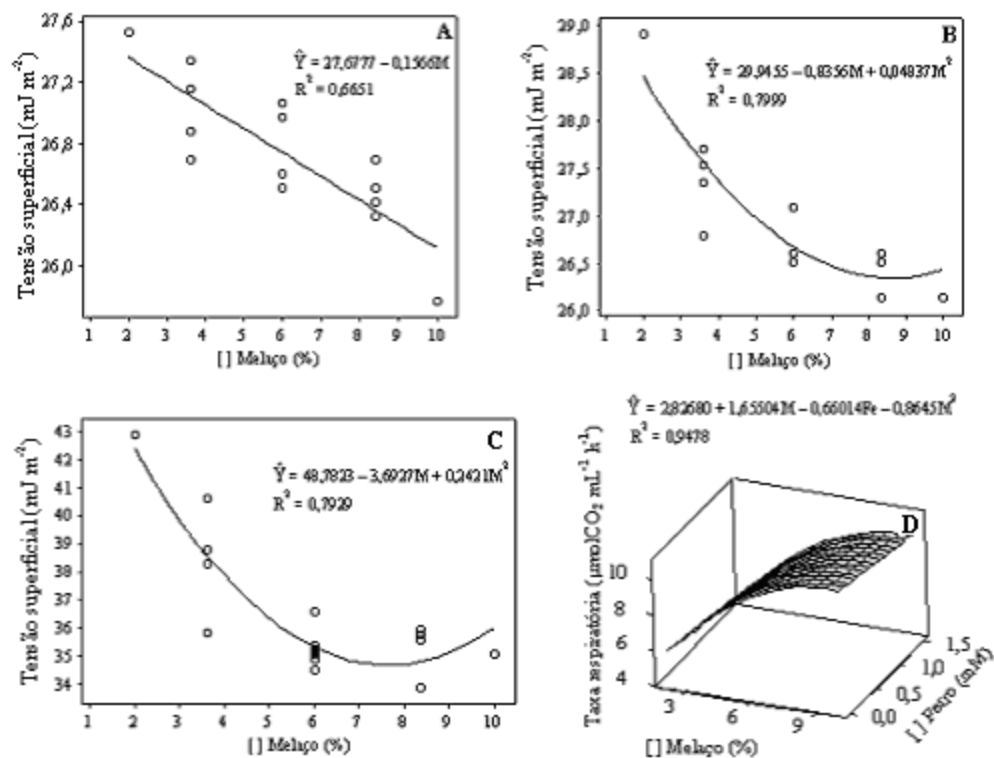


Figura 3.6. Modelos de regressão obtidos para a tensão superficial do extrato livre de células puro e diluído e para a taxa respiratória da cultura mista CM 2, composta por *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A e *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283. Os microrganismos foram inoculados em meio de cultura composto de manipueira a 50% (v/v) e de melação em concentrações variando de 2% a 10% (p/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 melação a 10% (p/v). Esse valor manteve-se inalterado após a diluição do extrato em 10 vezes (Tabela 3.5 e Figura 3.6 B), fato que mostra a produção de biossurfactantes em concentração equivalente a pelo menos 10 vezes a CMC. Resultado similar foi obtido com a cultura pura de *P. aeruginosa* LBBMA 88A (Figuras 3.1). Para *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283, os tratamentos com 2% de melação proporcionaram as menores tensões superficiais. Embora a resposta da cultura mista ao aumento da concentração de melação tenha sido similar à observada para *P. aeruginosa* LBBMA 88A, não se pode 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 melão no meio de cultura, resultado que se distingue do obtido com *P. aeruginosa* LBBMA 88A em cultura pura (Figura 3.1 B). Além disso, melão e ferro influenciaram significativamente a taxa respiratória, resultado observado somente para *B. subtilis* subsp. *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 por *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis* subsp. *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 ($p \leq 0,042$) sobre a tensão superficial do extrato diluído 100 vezes, novamente demonstrando a importância desse fator na produção de surfactantes 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 similar à obtida com *B. subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283. Esse resultado é um indício de que ele contribuiu de forma mais expressiva 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 em culturas mistas em resposta a variações de múltiplos fatores ambientais.

Conclusivamente, a cultura mista de *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283 produziu biossurfactantes capazes de reduzir a tensão superficial do meio de cultura para 25 mJ m^{-2} , 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.

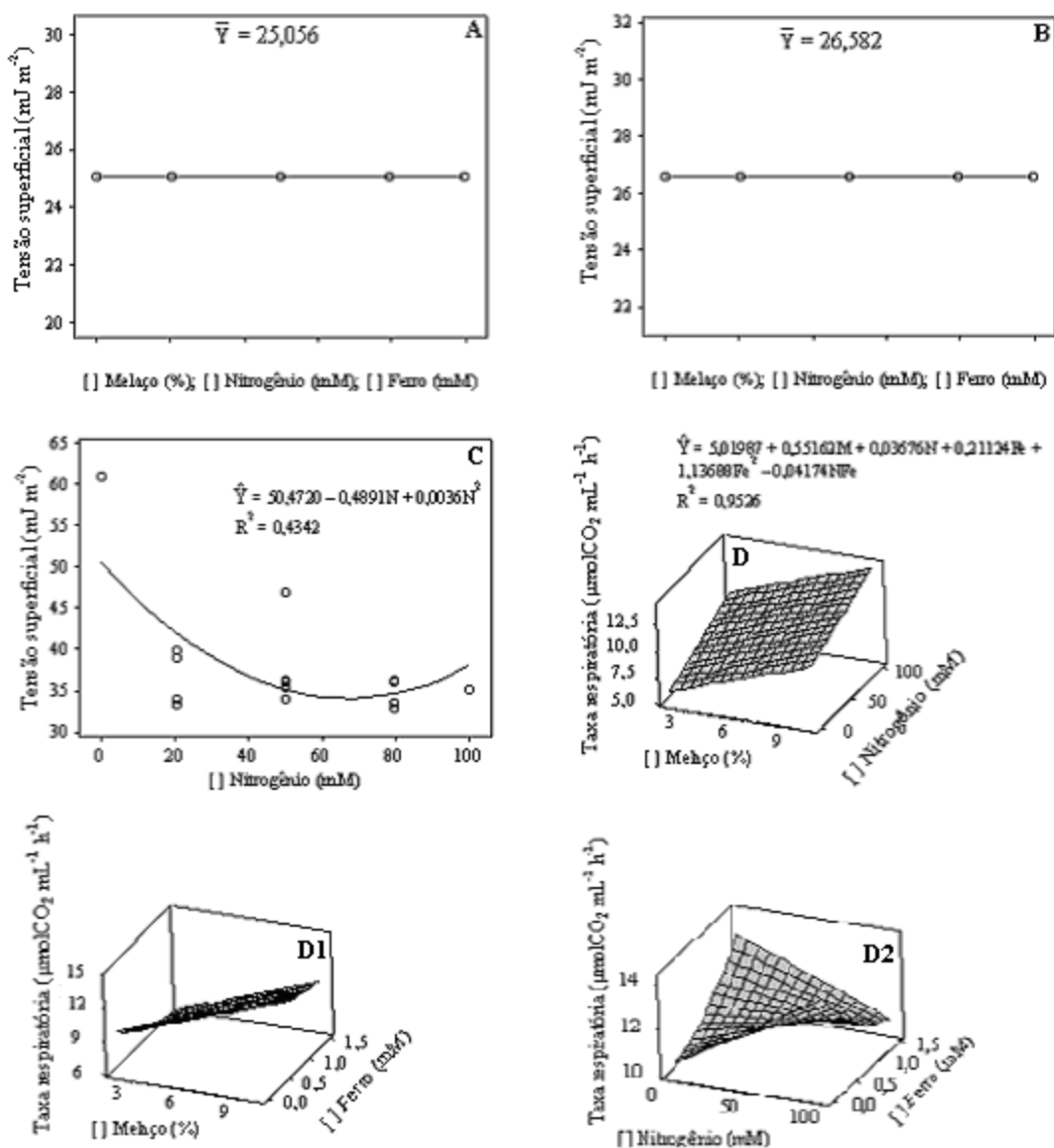


Figura 3.7. Modelos de regressão obtidos para a tensão superficial do extrato livre de células puro e diluído e para a taxa respiratória da cultura mista CM 3, composta por *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283. Os microrganismos foram inoculados em meio de cultura composto de manipueira a 50% (v/v) e de melço em concentrações variando de 2% a 10 % (p/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 melço e nitrogênio; (D1) taxa respiratória em função de melço e ferro; (D2) taxa respiratória em função de nitrogênio e ferro.

A concentração de melaço no meio de cultura foi o único fator que influenciou ($p \leq 0,002$) 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 não-diluído, 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).

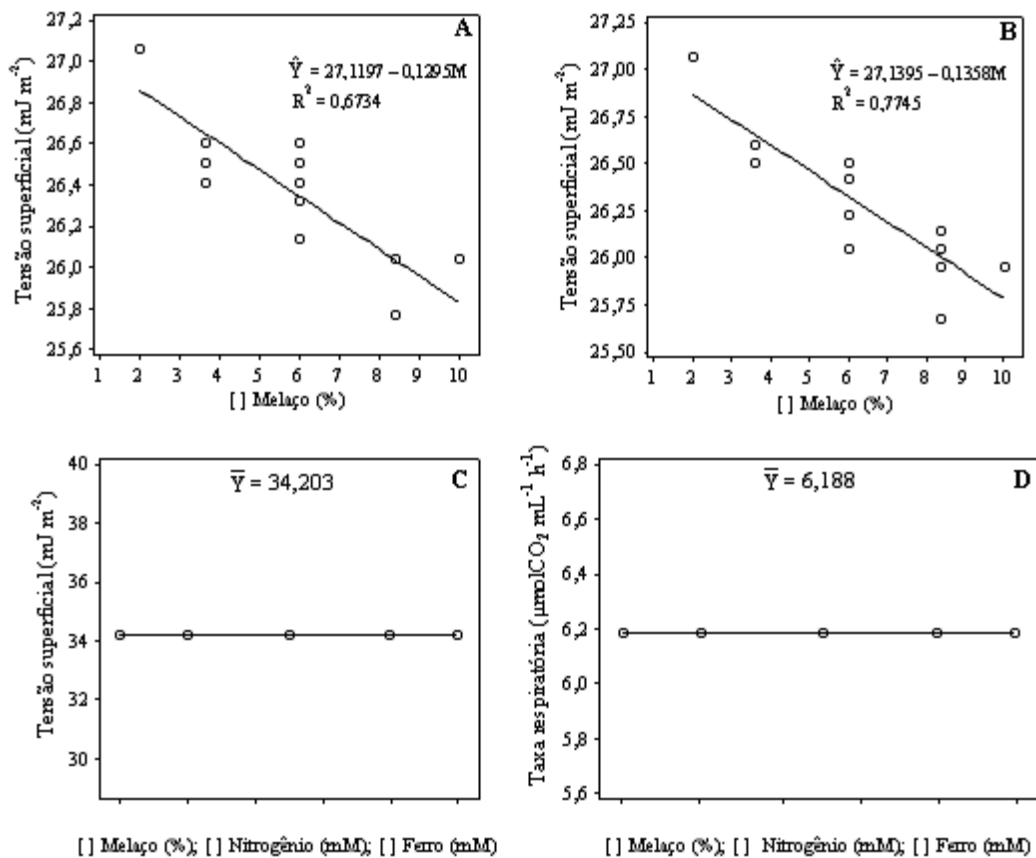


Figura 3.8. Modelos de regressão obtidos para a tensão superficial do extrato livre de células puro e diluído e para a taxa respiratória da cultura mista CM 4, composta por *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A, *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283. Os microrganismos foram inoculados em meio de cultura composto de maniveira a 50% (v/v) e de melaço em concentrações variando de 2% a 10% (p/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 (Figura 3.8 B) indica que não houve influência do aumento na concentração de melão no meio, como relatado para *P. aeruginosa* LBBMA 88A (Figura 3.1). Por se tratar de uma cultura mista, é esperada a presença, nesse extrato, de diferentes biossurfactantes. Biossurfactantes mais eficientes podem inicialmente contribuir para a obtenção de menores valores de tensão superficial, para isso necessitando estar em concentração pelo menos igual à sua CMC. Após as diluições do extrato, que eventualmente reduzem a concentração desses biossurfactantes mais eficientes para valores abaixo de sua CMC, as micelas dessas moléculas se desfazem e a tensão superficial aumenta. A partir desse ponto, micelas formadas por biossurfactantes menos eficientes, porém presentes em maior concentração, determinam o valor da tensão superficial.

A resposta da CM 4 ao aumento da concentração de melão é similar à observada na cultura pura do isolado *P. aeruginosa* LBBMA 88A, indicando que esse isolado tenha se destacado, quanto à produção de biossurfactantes, na cultura mista. A produção de ramnolípídeos homólogos em diferentes proporções, em resposta ao acréscimo de melão ao meio, pode ser a explicação para a variação na tensão superficial, uma vez que essas moléculas podem não apresentar a mesma atividade de superfície.

A comparação dos resultados de tensão superficial e taxa respiratória de cada isolado/cultura mista (Figura 3.9), demonstrou que o menor nível de similaridade foi entre os isolados *P. aeruginosa* LBBMA 88A e *B. subtilis* LBBMA 155 (98,4016%). A distância apresentada entre ambos foi muito baixa (0,0319687) em razão das médias similares para as variáveis avaliadas. A análise de agrupamento demonstrou que os isolados/culturas mistas atingiram as mesmas médias de tensão superficial e taxa respiratória em resposta às variáveis estudadas.

Diante da similaridade das médias alcançadas pelos isolados/culturas mistas estudados, conclui-se que todos são promissores como produtores de biossurfactantes. Contudo, 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 influência, maior o controle sobre o processo. Isso é verdadeiro especialmente quando o substrato de crescimento do microrganismo possui variações na sua composição, como é o caso do melão e da manipueira.

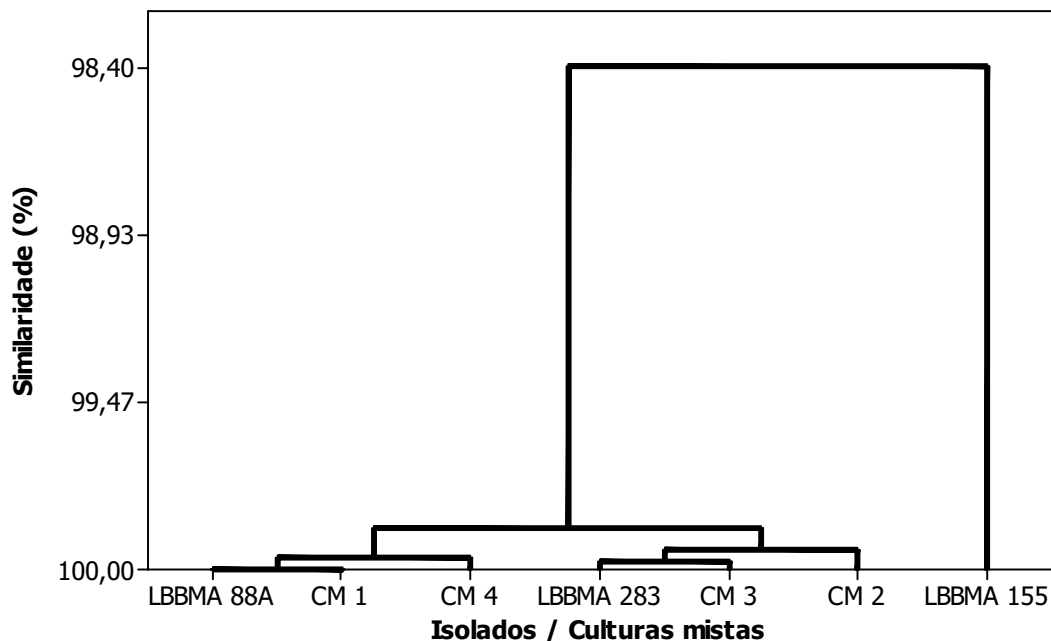


Figura 3.9. Dendrograma representando a similaridade entre isolados/culturas mistas.

Apesar disso, os isolados/culturas mistas que apresentaram significância para vários fatores, como o *Bacillus subtilis* LBBMA 155, *B. subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283, CM 2 (*Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A e *Bacillus subtilis* LBBMA 155) e CM 3 (*Bacillus subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283), não devem ter seu potencial para a produção de biossurfactantes desconsiderados. Estudos devem ser desenvolvidos para inclusive avaliar 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* subsp. *spizizenii* 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). Os resultados alcançados foram atribuídos apenas à variação da concentração de melão, mostrando que tanto o nitrogênio como o ferro não precisam ser controlados durante o processo produtivo desses biossurfactantes. O comportamento linear apresentado por eles é uma indicação do potencial para se obter maiores valores de concentração de biossurfactantes. 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 como melão e manipueira 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 desses resíduos. Nesse contexto, melão e manipueira mostraram-se substratos adequados para se estabelecer um processo biotecnológico de produção de biossurfactante pelos isolados testados.

3.4 CONCLUSÕES

Melaço e manipueira mostraram-se bons substratos para a produção de biossurfactante por culturas puras ou mistas de *P. aeruginosa* LBBMA 88A, *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283.

A produção de biossurfactante por *P. aeruginosa* LBBMA 88A é influenciada apenas pelo melaço.

A produção de biossurfactante por *B. subtilis* LBBMA 155 é influenciada por melaço e nitrogênio, mas não por ferro.

A produção de biossurfactante por *B. subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283 é influenciada tanto por melaço quanto por nitrogênio e ferro.

P. aeruginosa LBBMA 88A e a cultura mista CM 4, composta pelos isolados *P. aeruginosa* LBBMA 88A, *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis* subsp. *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 BIOSURFACTANTE 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 diversos microrganismos. Esses compostos têm sido aplicados em processos de recuperação de óleo em rochas-reservatórios, tanto por diminuir a tensão interfacial óleo-água de injeção, reduzindo as forças capilares que impedem o movimento do óleo através dos poros da rocha, quanto por reduzirem a viscosidade do óleo bruto, prolongando o tempo de exploração dos 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 (DMC) foi também investigado. A concentração de biossurfactantes no meio de crescimento correspondeu a 15 vezes a DMC. A tensão superficial do meio foi reduzida de 45,2 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 pela temperatura e pelo pH.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*; biossurfactantes; ramnolipídeos; resíduos agroindustriais.

4.1 INTRODUÇÃO

Um dos problemas enfrentados ainda hoje pelo setor petrolífero é o baixo aproveitamento dos reservatórios de petróleo. Na maioria das operações de exploração, a mobilização do óleo é de apenas de 30 a 50% do volume contido no reservatório (LUNDQUIST *et al.*, 2001). A recuperação avançada do petróleo melhorada por microrganismos (MEOR) refere-se a um conjunto de técnicas que utilizam microrganismos e/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 entre o óleo e o fluido injetado, reduzindo 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 extração dos reservatórios (LI *et al.*, 2002).

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

No gênero *Pseudomonas*, podemos encontrar espécies capazes de sintetizar surfactantes conhecidos como ramnolipídios, glicolipídios contendo ácidos graxos ligados a moléculas de ramnose (DESAI e BANAT, 1997; NITSCHKE *et al.*, 2005). Pelas suas características físico-químicas e biológicas, os ramnolipídios são considerados como a classe de biotensioativos mais promissores em termos de produção industrial. 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 mJ m⁻² (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 alto custo de produção (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 suporte tanto o crescimento celular quanto a produção do composto de interesse (NISTCHKE e PASTORE, 2006).

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

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Microrganismo

O isolado *P. 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

A cultura com o isolado bacteriano foi reativada 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 mL
Casaminoácidos	0,50 g	Água	q.s.p. 1.000 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	1.000 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 a retirada de sólidos insolúveis. Este processo consistiu no ajuste do pH do melação 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 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 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) (Tabela 4.2).

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 4.2).

Tabela 4.2. 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.

4.2.3 Preparo do inóculo e condições de cultivo

O inóculo foi preparado a partir da adaptação da cultura ao meio melaço e manipueira. A adaptação consistiu da 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 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 1.000 mL contendo 350 mL do meio de crescimento, de modo a se obter uma densidade óptica inicial a 600 nm equivalente a 0,100 (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 e agitação orbital de 200 rpm (New Brunswick Scientific, Edison, Nj-USA, Modelo C25KC incubator SHAKER, Classic series). excetuando-se o período de incubação, elevado para 72 horas. Após o cultivo, os meios foram centrifugados a 12.000 g (Jouan[®] MR-23*i*) por 15 minutos, e o extrato livre de células foi submetido à caracterização físico-química.

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 livres 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). As diluições dos extratos foram preparadas em água desionizada. 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 de querosene em um tubo de vidro (100 mm x 15 mm) vedado com Parafilm (American National Can[™]). 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 horas, até 48 horas após o início do ensaio. O índice de emulsificação foi determinado medindo-se a altura (cm) da camada emulsificada, 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 dodecil-sulfato de sódio (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 Efeito da salinidade, da temperatura e do pH sobre a 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 ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

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 NaOH e HCl. Os valores de pH testados foram: 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 desionizada, 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 DMC foi estimada pela relação entre a tensão superficial e as diluições do meio de cultura e corresponde à diluição na qual a tensão superficial começa a aumentar em razão da desagregação dos monômeros de biossurfactantes agrupados na forma de micelas e da transferência de monômeros da interface para o interior da solução (COOPER *et al.*, 1979). A DMC encontrada para *P. aeruginosa* LBBMA 88A, cultivado no meio a base de melaço e manipueira, foi correspondente à diluição de 15 vezes (Figura 4.1).

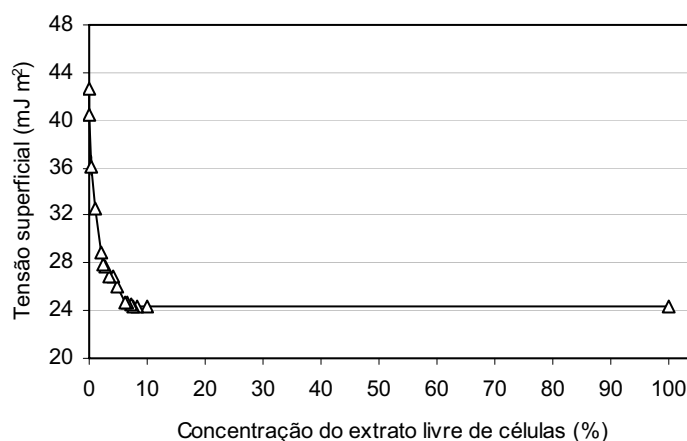


Figura 4.1. Variação da tensão superficial do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBBMA 88A com a concentração do extrato livre de células. A curva foi plotada com a média de três repetições. As barras de erro representam \pm o desvio-padrão.

Valores de DMC 5 a 10 vezes abaixo do apresentado foram encontrados para esse isolado quando o mesmo foi crescido em meio mineral contendo 2% de glicose (BATISTA *et al.*, 2006). Esses dados demonstram que os resíduos melaço e manipueira foram capazes de sustentar uma produção satisfatória de biossurfactantes por *P. aeruginosa* LBBMA 88A.

4.3.2 Atividade de emulsificação e estabilidade da emulsão

A propriedade física mais importante de uma emulsão é provavelmente sua estabilidade. O termo “estabilidade da emulsão” pode ser empregado em relação a três fenômenos essencialmente diferentes – sedimentação, floculação e quebra da emulsão por causa da coalescência das gotículas dispersas. A sedimentação resulta da diferença de densidade das duas fases e a floculação das colisões das partículas, que por sua vez podem levar à coalescência e à formação de glóbulos maiores (SHAW, 1970). Entre os fatores que podem influenciar a ocorrência de algum dos fenômenos acima está a viscosidade, a temperatura e o pH (SINGH *et al.*, 2007).

O surfactante produzido por *P. aeruginosa* LBBMA 88A, presente no extrato livre de células, foi capaz de formar emulsão estável com querosene, uma vez que seu volume, 24 horas após a formação, ainda correspondia a pelo menos 50% do volume original (Figura 4.2) (WILLUMSEN e KARLSON, 1997; DI MAMBRO, 2001). A emulsão manteve-se estável mesmo após 48 horas da sua formação. A emulsão formada entre o querosene e o biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBBMA 88A foi mais estável do que as formadas pelo surfactante sintético SDS[®] na concentração de 0,5% (p v⁻¹) (Figura 4.2).

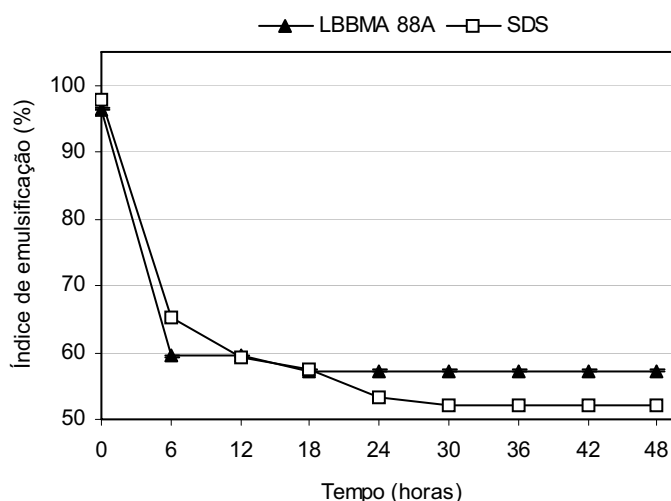


Figura 4.2. Atividade de emulsificação do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBBMA 88A, após cultivo em meio à base de melaço e manipueira por 72 horas a 30°C e 200 rpm e do surfactante sintético SDS[®]. As curvas foram plotadas com médias de três repetições. As barras de erro representam \pm o desvio-padrão.

O biossurfactante produzido pelo isolado em estudo também apresentou emulsões estáveis quando este foi cultivado em meio mineral com 2% de glicose por 5 dias a 28°C e 150 rpm (BATISTA et al., 2006).

4.3.3 Efeito da salinidade, da temperatura e do pH sobre a atividade do biossurfactante

A DMC e a estabilidade da emulsão formada pelo surfactante produzido por *P. aeruginosa* LBBMA 88A com querosene foram avaliadas 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 fornecidas ao microrganismo, que foram: temperatura de 30°C, pH entre 6,8 e 7,0, e em meio de cultura 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 livres de células contendo o biossurfactante foram expostos a temperaturas de 40, 55, 70 e 80°C, previamente às medições da tensão superficial, DMC e estabilidade de emulsão.

A emulsão formada pelo biossurfactante presente no extrato livre de células se manteve estável quando o mesmo foi submetido às temperaturas de 40 e 55°C, alcançando índices de emulsificação de 58,7%, valor superior ao padrão, 57,2% (Figura 4.3). Emulsões estáveis a essas temperaturas podem ser explicadas pela interação amido-surfactante (PISESOOKBUNTERNG e D'APPOLONIA, 1983; MERTA, *et al.*, 2001). Até a temperatura testada de 55°C, o amido proveniente da manipueira presente no meio de cultura permaneceu em suspensão contribuindo com o aumento da viscosidade do meio. Soluções mais viscosas permitem um número menor de colisões entre as microgotas da emulsão, o que possibilita a formação de emulsões mais estáveis (TADROS, 2005).

Os extratos contendo os biossurfactantes mantidos a 70 e a 80°C apresentaram índices de emulsificação de 30,4 e 31,8%, respectivamente, sendo consideradas emulsões não-estáveis (Figura 4.3).

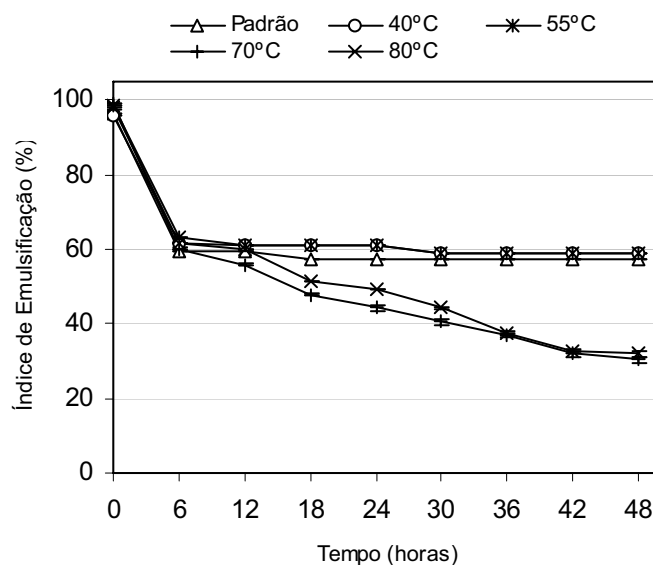


Figura 4.3. Efeito da temperatura sobre a atividade de emulsificação do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBBMA 88A, após cultivo em meio à base de melaço e manipueira, por 72 horas a 30°C e 200 rpm (padrão). As curvas foram plotadas com médias de três repetições. As barras de erro representam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

A submissão de surfactantes a altas temperaturas pode reduzir a solubilidade do biossurfactante e/ou favorecer reações químicas em solução, promovendo mudanças na composição dessas substâncias (SHAW, 1970; SINGH *et al.*, 2007). Ambas as explicações provocam a desestabilização das emulsões. Entretanto, a redução na solubilidade do biossurfactante promovida pelo aumento da temperatura é confirmada pelos resultados de DMC, as quais não se modificaram mesmo nas maiores temperaturas (Figura 4.4). A essas temperaturas o amido presente na manipueira pode ter precipitado reduzindo a viscosidade da solução. Soluções menos viscosas permitem aumento na frequência das colisões das partículas, levando a floculação e, por sua vez, a coalescência com a formação de glóbulos maiores (TADROS, 2005).

Estudos devem ser realizados para se averiguar o comportamento das moléculas de biossurfactante quando expostas a temperaturas entre 55 e 70°C, determinando-se o limite no qual o surfactante continua desenvolvendo sua atividade superficial, bem como a influência de solutos sobre essa atividade.

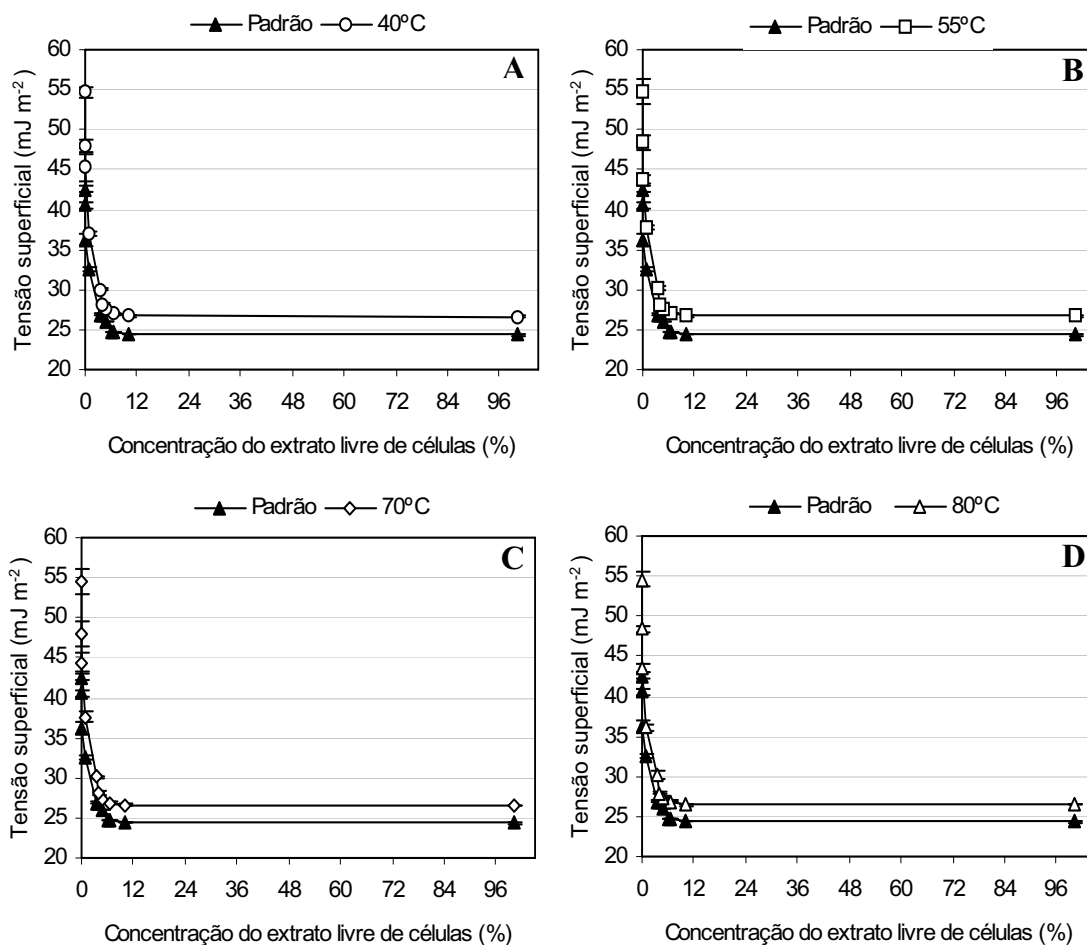


Figura 4.4. Efeito da temperatura sobre a atividade tensoativa do biosurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBBMA 88A, em meio à base de melaço e manipueira, após cultivo por 72 horas a 30°C e 200 rpm (padrão). (A) efeito da atividade tensoativa a 40°C; (B) efeito da atividade tensoativa a 55°C; (C) 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. As barras de erro representam \pm o desvio-padrão.

A estabilidade das emulsões e a atividade tensoativa do biosurfactante foram avaliadas também em relação à variação do pH, numa faixa de 4,0 a 10,0. Em pH 4,0 as emulsões formadas não foram consideradas estáveis, já que seus volumes, 24 horas após a formação, correspondiam a valores menores que 50% do volume original da emulsão (Figura 4.5). Condições de baixos valores de pH podem levar à hidrólise ácida do amido presente na manipueira, reduzindo a viscosidade do meio, aumentando as colisões e desestabilizando as emulsões. Baixos valores de pH também alteram as forças eletrostáticas envolvidas na formação das emulsões, o que promove floculação seguida da sedimentação dos flocos, acarretando em instabilidade (ANTUNES, 2007).

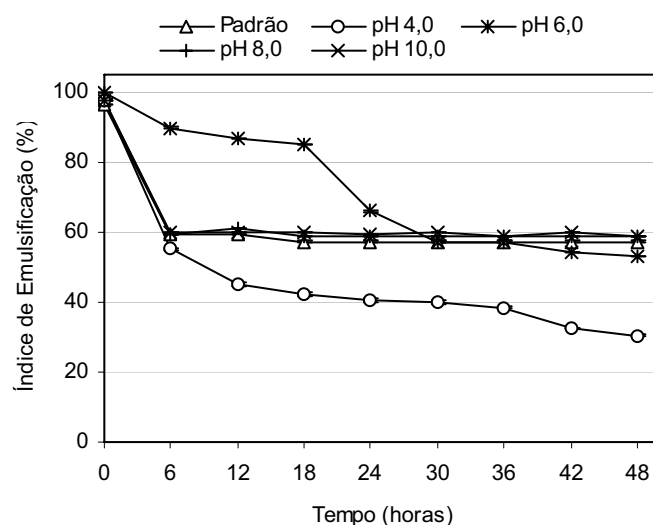


Figura 4.5. Efeito do pH sobre a estabilidade da emulsão do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBBMA 88A, após cultivo em meio à base de manipueira e melão por 72 horas a 30°C e 200 rpm (padrão, pH = 6,8). As curvas foram plotadas com médias de três repetições. As barras de erro representam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

O índice de emulsificação em pH 6,0, até 24 horas após o início do ensaio foi superior ao obtido nos meios com valores de pH 4,0, 8,0 e 10,0. Em soluções com valores de pH 6,8, 8,0 e 10,0, o índice de emulsificação manteve-se próximo a 60% a partir de 6 horas após a formação das emulsões (Figura 4.5). As emulsões formadas em pH 4,0 e 6,0 apresentaram valores de índice de emulsificação continuamente decrescentes (Figura 4.5).

A DMC do extrato livre de células contendo o biossurfactante não foi alterada pela variação dos valores de pH dos extratos (Figura 4.6).

Conclui-se que o biossurfactante contido nos extratos livres de células, em valores de pH superiores a 6,0, formaram emulsões estáveis com querosene. Além disso, a esses valores de pH a atividade tensoativa do biossurfactante não sofreu alteração.

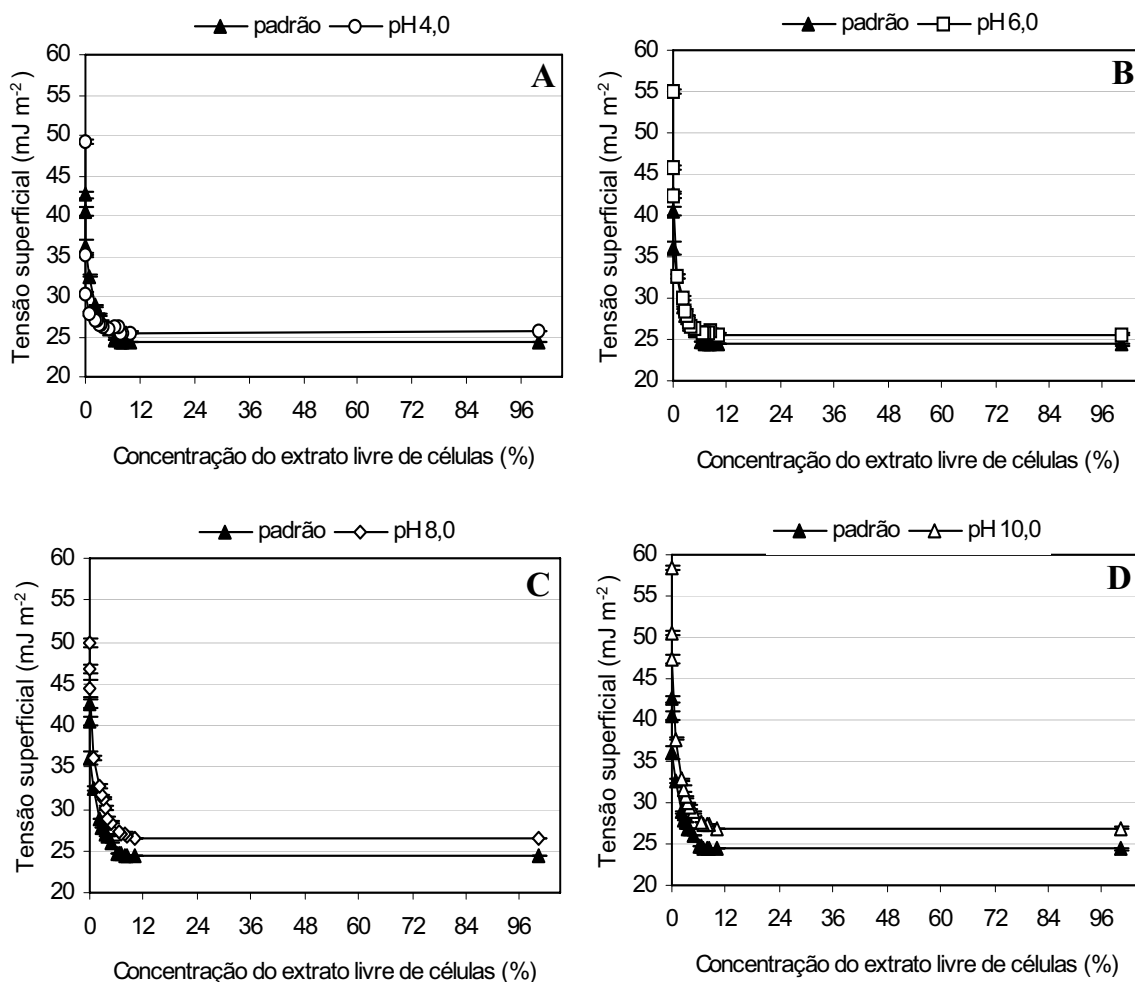


Figura 4.6. Efeito da variação do pH sobre a atividade tensoativa do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBBMA 88A, após cultivo por 72 horas a 30°C e 200 rpm (padrão, pH = 6,8). (A) efeito da atividade tensoativa com pH 4,0; (B) efeito da atividade tensoativa com pH 6,0; (C) efeito da atividade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

A estabilidade das emulsões e a atividade tensoativa do biossurfactante foram avaliadas também em relação à variação na concentração de NaCl adicionado ao meio de cultura, numa faixa de 1 a 15% (p/v). A adição de NaCl não afetou a estabilidade das emulsões formadas com querosene. 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.

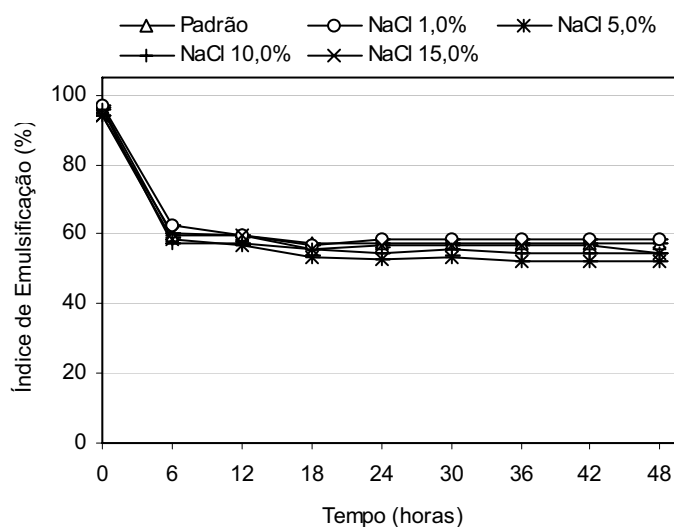


Figura 4.7. Efeito do aumento da salinidade sobre a estabilidade da emulsão do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBBMA 88A, após cultivo por 72 horas a 30°C e 200 rpm, sem adição de NaCl (padrão). As curvas foram plotadas com médias de três repetições. As barras de erro representam \pm o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

Nenhuma alteração foi verificada na DMC do extrato quando NaCl se encontrava a uma concentração de 1,0%. 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% de NaCl, a DMC alcançou valores de 100 vezes (Figura 4.8). O aumento nos valores de DMC, diretamente relacionados à concentração de NaCl, possivelmente é decorrente de uma estabilização termodinâmica dos agregados causada pela adsorção preferencial dos íons Na^+ , o que neutraliza as cargas da interface da micela, reduzindo assim a energia eletrostática repulsiva entre as moléculas de biossurfactantes (SANTOS *et al.*, 2009).

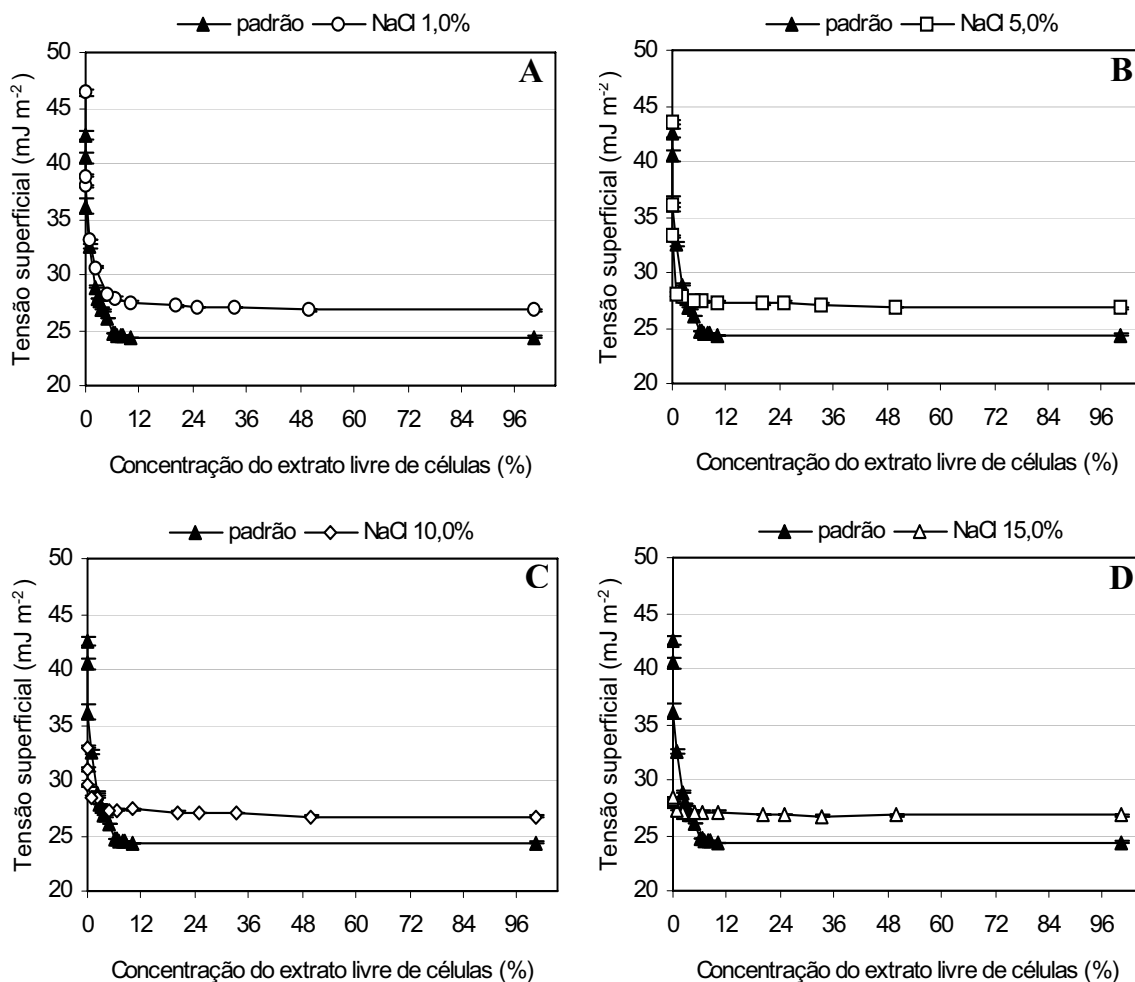


Figura 4.8. Efeito da salinidade sobre a atividade tensoativa do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBBMA 88A, após cultivo por 72 horas a 30°C e 200 rpm, sem adição de NaCl (padrão). (A) atividade tensoativa com adição de 1,0% de NaCl; (B) atividade tensoativa com adição de 5,0% de NaCl; (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. As barras de erro representam \pm o desvio-padrão.

Os valores de tensão superficial em todos os ensaios realizados tiveram seus valores ligeiramente aumentados após exposição do extrato a altas temperaturas, a variações de pH ou a diferentes concentrações de NaCl. As variações ficaram sempre em torno de 2 mJ m^{-2} . Tendo em vista que temperatura é um fator de grande influência na determinação das tensões superficiais, essa variação pode ser devida à ausência de controle de temperatura no equipamento utilizado para a realização das medidas de tensão.

Os resultados encontrados apontam o surfactante produzido por *P. aeruginosa* LBBMA 88A, nas condições de crescimento e produção testadas, como estável mesmo quando exposto a elevadas temperaturas e concentrações de sal.

Estudos envolvendo a caracterização de biossurfactantes quanto à estabilidade em condições extremas de pH, salinidade e temperatura têm sido reportados na literatura por alguns autores (NITSCHKE e PASTORE, 2006; THANİYAVARN *et al*, 2006). No entanto, esses trabalhos têm apresentado resultados não conclusivos a respeito das interações intermoleculares que conduzem a alterações na atividade dos biossurfactantes.

4.4. CONCLUSÕES

Melaço e manipueira foram capazes de sustentar uma produção satisfatória de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 88A.

O biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBBMA 88A foi capaz de formar emulsão estável com querosene, sendo o índice de emulsificação alcançado maior que o encontrado para o surfactante sintético SDS.

O biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBBMA 88A apresentou emulsões estáveis após a exposição do extrato a temperaturas de até 55°C. Variações na temperatura do extrato contendo o biossurfactante não alteraram os valores de DMC.

A variação do valor de pH para 4,0 desestabilizou as emulsões formadas pelo biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBBMA 88A. A DMC do extrato livre de células contendo o biossurfactante não foi alterada pela variação dos valores de pH dos extratos.

A adição de NaCl não afetou a estabilidade das emulsões formadas pelo biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBBMA 88A. Aumento na concentração de NaCl promoveu elevação nos valores de DMC dos extratos contendo o biossurfactante.

4.5. 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.

ANTUNES, M.de S. Estudo à microscopia eletrônica da estabilidade física de emulsões lipídicas utilizadas em misturas 3 em 1. *Rev Bras Nutr Clin*, v.22, n.1, p.45-53, 2007.

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. 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.

BATISTA, S.B., MOUNTEER, A.H., AMORIM, F.R.; TÓTOLA, M.R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology*, v.97, p.868-875, 2006.

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.

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

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.

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.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potencial. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, v.61, p.47-64, 1997.

DI MAMBRO, V.M. *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, 2001.

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.

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

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.

LANG, S.; F. WAGNER. Structure and properties of biosurfactants, p. 21–47, 1987. In N. Kosaric, W. L. Cairns, and N. C. C. Gray (ed.), *Biosurfactants and biotechnology*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.

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.

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. 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. 2001.

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.

MERTA, J.; TORKKELI, M.; IKONEN, T.; SERIMAA R.; STENIUS, P. Structure of cationic starch (CS)/anionic surfactant complexes studied by small-angle X-ray scattering (SAXS), *Macromolecules*, v. 34, n. 9, p. 2937–2946, 2001.

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

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., 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.

PISEOOKBUNTERNG W.; D'APPOLONIA B. Bread staling studies. I. Effect of surfactants on moisture migration from crumb to crust and firmness values of bread crumb. *Cereal Chemistry*, v.60, p. 298–300, 1983.

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.

- 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.
- ROUKAS, T. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. *Process Biochemistry*, v.33, p.8, p.805-810, 1998.
- SANTOS, F.K.G; NETO, E.L.B.; MOURA, M.C.P.A.;DANTAS, T.N.C.; NETO, A.A.D. Molecular behavior of ionic and nonionic surfactants in saline medium. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.333, n.1-3, p.156-162, 2009.
- SHAW, D.J. *Introduction to colloid and surface chemistry*. Editora Edgard Blucher Ltda. 181p, 1970.
- SING, A.; VAN HAMME, J.D.;WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Parte 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, v.25, p.99-121, 2007.
- TADROS, T.F. *Applied Surfactants: principles and applications*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA. 634p, 2005.
- THANIYAVARN, J., CHONGCHIN, A., WANITSUKSOMBUT, N., THANIYAVARN, S., PINPHANICHAKARN, P., LEEPIPATPIBOON, N., MORIKAWA, M.; KANAYA, S. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* A41 using palm oil as carbon source. *The Journal of General and Applied Microbiology*, v.52, p.215-222, 2006.
- WILLUMSEN, P.A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactant and bioemulsifiers. *Biodegradation*, v.7, p.415-423., 1997.
- YANG, J.E.; SKOGLEY, E.O.; SCHASS, P.E.; KIM, J.J. A simple espectrophotometria determination of nitrate in water, resin and extracts. *Soil Science Society of America Journal*, v.62, p1108-1115, 1998.

CONCLUSÕES GERAIS

O meio composto da associação de melaço e manipueira demonstrou ser um substrato alternativo promissor para a produção de surfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus* spp. Os isolados *P. aeruginosa* LBBMA 88A, *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 283 foram os de maior destaque.

A utilização de melaço e manipueira como substrato pode reduzir os custos de produção de biossurfactantes em escala comercial para níveis competitivos, em relação aos similares sintéticos e ainda destinar de forma correta esses resíduos diminuindo as chances de contaminação ambiental.

O meio de cultura à base de melaço e manipueira permitiu a produção de biossurfactantes tanto por culturas puras quanto culturas mistas. *P. aeruginosa* LBBMA 88A e a cultura mista composta por *P. aeruginosa* LBBMA 88A, *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis* subsp. *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.

O meio baseado em melaço e manipueira alcançou resultados satisfatórios para a produção de surfactante por *P. aeruginosa* LBBMA 88A. O meio permitiu a produção de ramnolipídeos com características desejáveis a aplicações ambientais, devido sua estabilidade quando em condições extremas de salinidade, temperatura e pH.