

## PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR MICRORGANISMOS ISOLADOS DE SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO DIESEL

Andressa Decesaro e Magali Rejane Rigon

Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, Campus I, BR 285, km 171, CP 611, 99001-970 Passo Fundo – RS, Brasil

Antônio Thomé e Luciane Maria Colla\*

Universidade de Passo Fundo, Campus I, BR 285, km 171, CP 611, 99001-970 Passo Fundo – RS, Brasil

Recebido em 26/8/12; aceito em 5/2/13; publicado na web em 15/4/13

PRODUCTION OF BIOSURFACTANTS BY MICRORGANISMS ISOLATED FROM SOIL CONTAMINATED WITH DIESEL OIL. The aim of this work was to produce biosurfactants through submerged fermentation using microorganisms isolated from soil contaminated with diesel. Microorganisms were isolated, characterized by the production of biosurfactants, and used to study the influence of type, induction and concentration of ammonium sulfate as a nitrogen source in the culture medium. The microorganisms that showed best results, in terms of production of biosurfactants, were identified as being of the genus *Pseudomonas* and *Bacillus*. The biosurfactants produced proved capable of reducing the surface tension of the media to 39 mN/m and 34 mN/m, respectively. Higher biosurfactant production was obtained in the medium containing 1% soybean oil without ammonium sulfate.

Keywords: *Bacillus*; *Pseudomonas*; submerged fermentation.

### INTRODUÇÃO

Os problemas ambientais têm se tornado cada vez mais frequentes e críticos, principalmente devido ao crescimento populacional e o aumento da atividade industrial. Isso se reflete na poluição do solo e das águas superficiais e subterrâneas.<sup>1,2</sup>

Os biossurfactantes são compostos microbianos que possuem uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica,<sup>3-6</sup> exibindo alta atividade surfactante e emulsificante,<sup>7</sup> sendo adicionados ao ambiente para estimular o processo de biorremediação, tornando os poluentes disponíveis à biodegradação.<sup>8</sup>

Os compostos oleosos são degradados por microrganismos capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono para obtenção de energia.<sup>9</sup> O uso de microrganismos adaptados à utilização de resíduos oleosos, como é o caso deste trabalho, pode possibilitar a obtenção de elevadas produtividades de biossurfactantes, em virtude da possível capacidade destes microrganismos em produzirem compostos como resposta às condições ambientais. Segundo Matsuura<sup>7</sup>, microrganismos ambientados a crescerem em substratos oleosos em geral são bons produtores de biossurfactantes.

A produção de biossurfactantes justifica-se pelas inúmeras aplicações que estes possuem em diferentes setores industriais, tais como de alimentos,<sup>10-12</sup> cosméticos,<sup>13</sup> agricultura,<sup>14,15</sup> detergentes e medicina.<sup>4,6,16-18</sup> Contudo, a maior área para aplicação dos biossurfactantes é a indústria do petróleo, tanto para a produção deste como para incorporação nas formulações de óleo, dispersão de derramamento de óleo em solo e no mar, remoção de lodo de óleo de tanques de estocagem, na recuperação melhorada de petróleo e na descontaminação ambiental por meio da biorremediação.<sup>7,19</sup>

Os biossurfactantes apresentam vantagens relacionadas à baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, variedade de estruturas químicas, estabilidade em condições extremas de pH, temperatura e salinidade.<sup>3,8,18</sup>

Dentre os problemas relacionados ao uso de biossurfactantes está

o seu alto custo de produção, associado a métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros. A diminuição dos custos de produção destes compostos pode ser realizada a partir da otimização dos processos e dos meios de cultivo utilizados.<sup>20</sup> Sendo assim, objetivou-se o isolamento e seleção de microrganismos produtores de biossurfactantes a partir de solo contaminado com óleo diesel, bem como o estudo de um meio de cultivo para produção destes compostos.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Isolamento e manutenção dos microrganismos

Os microrganismos foram isolados de um solo contaminado por óleo diesel, ocorrido por vazamento em um posto de combustível, na cidade de Passo Fundo, estado do Rio Grande do Sul, Brasil, no ano de 2005. A coleta do solo para o isolamento dos microrganismos foi realizada em 2009. O isolamento foi realizado a partir de uma amostra do solo contaminado, realizando-se diluições seriadas em água peptonada 0,1% e plaqueamento em ágar PCA (Plate Count Agar). As colônias foram sucessivamente isoladas no mesmo meio e posteriormente mantidas em tubos com ágar inclinado em refrigerador a 4 °C.

#### Seleção de microrganismos produtores de biossurfactantes

As cepas isoladas foram testadas para a produção de biossurfactantes em fermentação submersa utilizando o meio de cultivo composto por: extrato de levedura (10 g/L), sulfato de amônio (5 g/L), fosfato de potássio (5 g/L), sulfato de magnésio (0,5 g/L)<sup>21</sup> e 1% de óleo diesel como indutor da produção de biossurfactantes.

A ativação dos microrganismos foi realizada em meio Plate Count (PC), a partir dos microrganismos mantidos em meio PCA (Plate Count Agar), em erlenmeyers de 300 mL contendo 100 mL do meio PC, com posterior incubação em agitador orbital a 160 min<sup>-1</sup> por 48 h a 30 °C.

\*e-mail: lmcolla@upf.br

A fermentação foi realizada em erlenmeyers de 300 mL contendo 30 mL do inóculo previamente preparado e 70 mL do meio de cultivo, a 30 °C, em agitador orbital a 160 min<sup>-1</sup> durante 5 d. Amostras foram realizadas no tempo inicial e a cada 24 h para a determinação das atividades emulsificantes óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O), a fim de estimar a produção de biossurfactantes extracelulares.<sup>7,19</sup>

### Identificação das cepas pré-selecionadas para a produção de biossurfactantes

Os microrganismos selecionados como bons produtores de biossurfactantes após os ensaios de fermentação submersa foram identificados no Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo. Os microrganismos foram isolados e plaqueados em Ágar Sangue e Ágar Maconkey e posteriormente submetidos à caracterização fisiológica e bioquímica.<sup>22,23</sup>

### Estudo de meio de cultivo

As cepas selecionadas na etapa anterior foram utilizadas para a avaliação da produção de biossurfactantes. As modificações realizadas no meio de cultivo utilizado na seleção foram em relação à concentração e tipo de indutor e à adição ou não de sulfato de amônio (1%) como fonte de nitrogênio. O meio contém também como fonte de nitrogênio o extrato de levedura, portanto, objetivou-se verificar o efeito da redução da concentração de nitrogênio no meio de cultivo sobre a produção de biossurfactantes. Para tanto, foi utilizado um Planejamento Fatorial Completo 2<sup>3</sup> (Tabela 1), a fim de se determinar as variáveis significativas sobre a produção de biossurfactantes. O mesmo planejamento foi aplicado para cada uma das cepas selecionadas na etapa anterior.

**Tabela 1.** Planejamento Fatorial Completo 2<sup>3</sup> para a avaliação da influência do tipo de indutor, concentração do indutor e presença de sulfato de amônio sobre a produção de biossurfactantes em fermentação submersa

Experimento	Indutor	Concentração de Indutor	Adição de sulfato de amônio (1%)
1	OS (-1)	1% (-1)	Sem (-1)
2	OD (+1)	1% (-1)	Sem (-1)
3	OS (-1)	2% (+1)	Sem (-1)
4	OD (+1)	2% (+1)	Sem (-1)
5	OS (-1)	1% (-1)	Com (+1)
6	OD (+1)	1% (-1)	Com (+1)
7	OS (-1)	2% (+1)	Com (+1)
8	OD (+1)	2% (+1)	Com (+1)

OS: óleo de soja; OD: óleo diesel.

Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 300 mL com 100 mL de meio inicial e inoculação na razão de 1:10 com inóculo previamente preparado. Os experimentos foram mantidos em agitador orbital a 30 °C durante 4 d, sendo retiradas alíquotas no tempo inicial e nos tempos de 2 d e de 4 d. A produção de biossurfactantes nesta etapa foi avaliada com base na determinação da tensão superficial do meio, sendo esta realizada em triplicata.

### Determinações analíticas

As atividades emulsificantes (AE) óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O) foram determinadas segundo metodologia proposta por Martins *et al.*<sup>24</sup> utilizando-se 3,5 mL de extrato e 2 mL de óleo de milho.

A mistura foi agitada em agitador vórtex a 700 m<sup>-1</sup>, por 1 min. Após 60 min de repouso foi lida a absorbância do meio emulsificado O/A em espectrofotômetro a 610 nm. A leitura foi realizada diminuindo-se a absorbância do branco (Equação 1), obtida a partir da leitura da amostra, dessa forma, obteve-se a atividade emulsificante O/A. Após 24 h de repouso foi realizada a leitura da altura da emulsão A/O formada e da altura total (altura da emulsão mais altura da camada remanescente de óleo), dividiu-se o valor da altura da emulsão pelo total e multiplicou-se por 100 para verificar a relação centesimal entre as alturas (Equação 2), ainda diminui-se a emulsão do branco da emulsão da amostra gerando a atividade emulsificante A/O (Equação 3). O branco foi preparado utilizando água no lugar da amostra.

$$AE_{O/A} = (E_{amostra} - E_{branco}) \cdot D \quad (1)$$

$$E = (h_{emulsão} / h_{total}) \cdot 100 \quad (2)$$

$$AE_{A/O} = (E_{amostra} - E_{branco}) \cdot D \quad (3)$$

sendo: AE = atividade emulsificante (UE); O/A = óleo em água; A/O = água em óleo; ABS = absorbância; E = relação centesimal entre a altura da emulsão água/óleo e a altura total; D = diluição da amostra em água.

Segundo Matsuura<sup>7</sup>, para verificar a produção de biossurfactante numa cultura microbiana é necessário haver um método para determinar a atividade surfactante e o método mais empregado é a medição da tensão superficial do sobrenadante. Neste sentido, a tensão superficial dos meios foi realizada na ausência de células de acordo com o método do anel (Du-Nuoy's ring method).

### Tratamento dos dados

Os resultados foram avaliados com base na análise de variância, a qual foi obtida a partir do módulo Experimental Design do Software Statistica 6.0, utilizando os valores referentes à redução da tensão superficial no quarto dia de fermentação, para melhor compreensão dos resultados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Seleção de microrganismos produtores de biossurfactantes

Foram isoladas cinco cepas de microrganismos do solo contaminado com óleo diesel, denominadas X<sub>1</sub> a X<sub>5</sub>, sendo que todas foram testadas para a produção de biossurfactantes em fermentação submersa. Esta é a técnica de fermentação mais relatada na literatura para a produção destes compostos em virtude de variáveis como a homogeneidade do meio, o pH e a transferência de calor serem mais facilmente controladas e devido a facilidade e simplicidade de operação.<sup>25</sup>

As Figuras 1 e 2 apresentam as atividades emulsificantes O/A e A/O obtidas durante a fermentação a partir dos cinco microrganismos isolados. Com exceção do microrganismo X<sub>1</sub>, todos apresentaram aumento na atividade de emulsão O/A em relação ao tempo inicial. As máximas atividades O/A foram obtidas entre o segundo e terceiro dias de cultivo. O microrganismo X<sub>5</sub> foi o que produziu a maior atividade de emulsificação O/A, de 7,16 UE.

Em relação às atividades emulsificantes A/O, pode-se observar que os microrganismos X<sub>2</sub> e X<sub>3</sub> não apresentaram atividade de emulsificação água em óleo. O microrganismo X<sub>1</sub> apresentou maior atividade emulsificante em 5 d (62 UE) e o X<sub>5</sub> (154 UE) em 2 d de fermentação. No 5º dia de fermentação foi observada a máxima capacidade de emulsificação para o microrganismo X<sub>4</sub> (201,60 UE).

A máxima atividade emulsificante O/A, obtida a partir do microrganismo X<sub>5</sub>, foi de 7,16 UE. Já para atividade emulsificante A/O, o

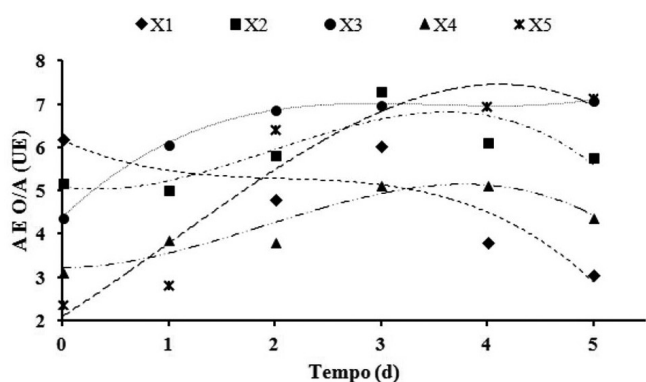


Figura 1. Atividade emulsificante O/A durante a fermentação submersa para a produção de biossurfactantes a partir de microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel

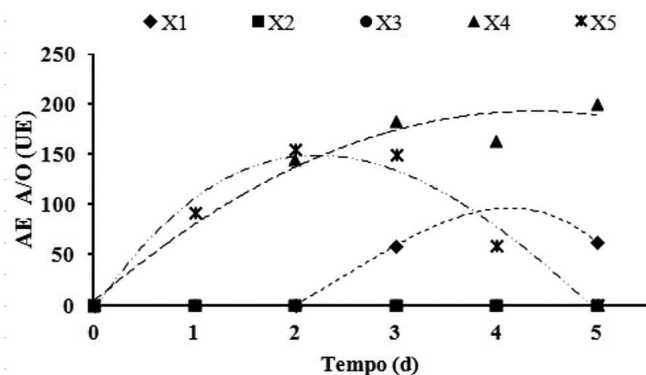


Figura 2. Atividade emulsificante A/O durante a fermentação submersa para a produção de biossurfactantes a partir de microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel

microrganismo  $X_4$  foi o que apresentou a maior atividade, de 201,6 UE. Estas atividades emulsificantes podem ser consideradas altas quando comparadas às obtidas em outros estudos. Rodrigues *et al.*<sup>26</sup> realizaram a produção de biossurfactantes em fermentação em estado sólido por *Aspergillus fumigatus* obtendo o valor máximo de atividade emulsificante O/A em torno de 6,1 UE e para atividade emulsificante A/O o valor máximo encontrado foi em torno de 144,5 UE. Bortoluzzi *et al.*<sup>27</sup> verificaram a produção de biossurfactantes a partir de uma cepa de *Aspergillus sp.* em fermentação em estado sólido obtendo atividades emulsificantes O/A de 6,52 UE e de A/O de 91,80 UE.

Pinto *et al.*<sup>28</sup> verificaram a produção de biossurfactantes utilizando quatro culturas: *Corynebacterium aquaticum* (Cultura 1), *Corynebacterium aquaticum* e *Bacillus sp.* (Cultura 2), *Corynebacterium sp.*, *Bacillus cereus* e *Bacillus mycoides* (Cultura 3) e *Bacillus subtilis* (Cultura 4). As culturas foram isoladas de efluentes provenientes da lavagem de caminhões transportadores de combustíveis, exceto a última, sendo a produção realizada em fermentação submersa. As maiores atividades emulsificantes, tanto O/A, quanto A/O foram obtidas em 60 h ou 72 h de cultivo. As máximas atividades emulsificantes O/A e A/O encontradas foram obtidas nos meios fermentados pela *Corynebacterium aquaticum*, de 160,34 UE e 24,84 UE, respectivamente. Comparando os valores de Pinto *et al.* (2009) com os deste estudo verifica-se que a atividade emulsificante O/A foi menor, mas a atividade emulsificante A/O atingiu valores bem mais elevados.

Martins *et al.*<sup>29</sup> estudaram a influência das variáveis na produção de lipases concomitantemente com a produção de biossurfactantes, sendo usados dois diferentes fungos. As máximas atividades emulsificantes, para o fungo *Phialemonium sp.*, foram de 12,21 UE  $g^{-1}$  para

O/A e 6,11 UE  $g^{-1}$  para A/O, já para o fungo *Aspergillus fumigatus* as máximas atividades emulsificantes foram de 11,54 UE  $g^{-1}$  para O/A e 7,36 UE  $g^{-1}$  para A/O.

A partir dos resultados de atividades emulsificantes O/A e A/O foram calculadas as produtividades máximas das emulsões no tempo a partir da Equação 4, sendo os resultados apresentados na Tabela 2.

$$\text{Produtividade máxima} = \frac{\text{Atividade máxima} - \text{Atividade inicial}}{\text{Tempo}} \quad (4)$$

Tabela 2. Produtividade de emulsão O/A e A/O para os cinco microrganismos testados

Microrganismo	AE	Atividade Inicial (UE)	Atividade máxima (UE)	Tempo (d)	Produtividade de máxima (UE/d)
$X_1$	O/A	6,21	-	-	-
	A/O	0	62,74	5	12,54
$X_2$	O/A	5,18	7,31	3	0,71
	A/O	-	-	-	-
$X_3$	O/A	4,39	6,99	3	0,86
	A/O	-	-	-	-
$X_4$	O/A	3,12	5,13	3	0,67
	A/O	0	201,60	5	40,32
$X_5$	O/A	2,38	7,10	5	0,94
	A/O	0	154,5	2	77,25

$X_1$  a  $X_5$ : microrganismos testados para a produção de biossurfactantes.

Considerando a produtividade de emulsão O/A o microrganismo que se destacou por ter maior produção por dia foi o microrganismo  $X_5$  com 0,94 UE/d, seguido pelo microrganismo  $X_3$  com 0,86 UE/d. Os microrganismos  $X_4$  e  $X_5$  foram os melhores produtores de compostos com atividade emulsificante A/O, com produtividades de 40,32 UE/d e 77,25 UE/d, respectivamente. Assim, os microrganismos selecionados para as etapas posteriores foram o  $X_4$  e  $X_5$ .

### Identificação dos microrganismos selecionados

Os resultados da identificação bioquímica dos microrganismos  $X_4$  e  $X_5$  estão apresentados no Quadro 1. Para identificação dos microrganismos  $X_4$  e  $X_5$  inicialmente utilizou-se Ágar Sangue como meio de cultivo. O microrganismo  $X_5$  ficou identificado como sendo do gênero *Bacillus*. O microrganismo  $X_4$  foi cultivado também em ágar MacConkey a fim de se confirmar o tipo microbiano, tendo sido identificado como do gênero *Pseudomonas*. Com base nos dados da identificação bioquímica supõe-se que sejam cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus pumilus*, entretanto, para confirmação seria necessária a realização da análise da reação em cadeia da polimerase (PCR) através do gene RNA ribossomal 16S, conforme relatado por Bueno *et al.*<sup>30</sup>

Para a classificação do gênero *Pseudomonas* devem ser consideradas algumas características metabólicas. O gênero *Pseudomonas* é produtor de citocromo-oxidase, sendo que a presença desta enzima é usada para diferenciar o grupo das *Pseudomonas* do grupo das *Enterobacteriaceae*. Apresentam metabolismo oxidativo e utilizam relativamente poucos carboidratos para seu crescimento.<sup>31</sup>

Microscopicamente as bactérias do gênero *Pseudomonas* são bacilos gram-negativos retos ou ligeiramente curvos, com dimensões entre 0,5 – 1,0  $\mu m$  de largura e 1,5 – 5,0  $\mu m$  de comprimento, não formadores de esporos, integrante da família *Pseudomonadaceae*.<sup>32</sup>

**Quadro 1.** Resultados dos testes bioquímicos utilizados para a identificação dos gêneros microbianos

Ágar	Ágar Sangue	Ágar Sangue	Ágar MacConkey
<b>MORFOLOGIA/COLÔNIAS</b>			
Tamanho	Pequeno	Pequeno	Pequeno
Bordas/Forma Colônias	Irregular	Irregular	Circular
Tipo de Elevação	Achatada	Umbilical	Convexa
Densidade	Opaca	Opaca	Translúcida
	Traslúcida		
Consistência	Cremosa	Cremosa	Mucosa
Cor	Verde Escuro	Verde Escuro	Rosa
Lactose/Hemólise	X	X	(-)
Bacilo/Coco	Bacilo Longo	Bacilo Longo	Bacilo Curto
Gram	(+)	(-)	(-)
<b>PROVAS BIOQUÍMICAS</b>			
Catalase	(+)	(+)	(+)
Oxidase	(-)	(+)	(+)
Coagulase			
OF + Glicose	NR	Fermentação	Fermentação (oxidativo)
TSI – Base	Ácido	Alcalino	NR
TSI – Bisel	Ácido	Ácido	NR
TSI – H <sub>2</sub> S	(-)	(-)	(-)
TSI – Gás	(+)	(+)	(-)
LIA – Base	Ácida	Alcalino	Ácida
LIA – Bisel	Alcalino	Alcalino	Alcalino
LIA – H <sub>2</sub> S	(-)	(-)	(-)
SIM – Motilidade	Imóvel	Móvel	Móvel
SIM - H <sub>2</sub> S	(-)	(-)	(-)
SIM – Indol	(-)	(-)	(-)
UREASE	(-)	(-)	(-)
CITRATO	(+)	(+)	(+)
VM	(+)	(-)	(+)
NITRATO-NITRITO	(-)	(-)	(-)
Diagnóstico	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>

Macroscopicamente, o gênero *Pseudomonas* cresce formando colônias irregulares e opacas, em uma faixa ampla de temperaturas. A maioria das cepas produz pigmentos hidrossolúveis tais como a pioverdina, o qual confere ao meio de cultura coloração esverdeada.<sup>33</sup> As características obtidas na literatura corroboram com as obtidas para o gênero *Pseudomonas* em testes realizados para este estudo.

O gênero *Bacillus*, pertencente à família *Bacillaceae*, consiste em microrganismos gram-positivos. Taxonomicamente, de acordo com a segunda edição do Manual Bergey,<sup>34</sup> o gênero *Bacillus* pertencente à família I de *Bacillaceae*.

Microscopicamente as células bacterianas do presente gênero têm uma dimensão que varia 0,5-2,5 µm x 1,2-10 µm e macroscopicamente podem ser observadas colônias de 2 a 4 mm diâmetro de formas redondas, borda lisa, irregular, e de consistência cremosa.<sup>35</sup>

Em estudo realizado por Sirtori,<sup>36</sup> após caracterização bioquímica obteve-se que as colônias do microrganismo analisado eram amplas, membranosas e irregulares, sendo a bactéria catalase positiva e oxidase negativa, dessa maneira os testes indicaram que a bactéria

pertencia ao gênero *Bacillus*. As características do microrganismo identificado como *Bacillus* deste trabalho foram iguais confirmando o gênero do mesmo.

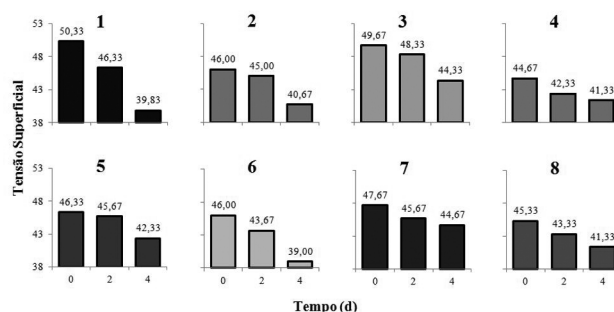
Bognolo<sup>14</sup> relatou que biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas* demonstraram resultados promissores na remoção de concreto asfáltico de petróleo (CAP) em areias contaminadas. Rocha<sup>37</sup>, em seu estudo, utilizou uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* isolada a partir de efluente contaminado com óleo de um navio petroleiro. Com base nos estudos de estabilidade dos biossurfactantes produzidos verificou-se que o mesmo pode ser aplicado na biorremediação, em ambientes com alta salinidade, temperatura e pH elevado, como por exemplo derramamento de petróleo em alto mar.

Os microrganismos identificados são comumente isolados em solos contaminados com resíduos oleosos, podendo estar envolvidos nos processos de biodegradação destes e na produção de biossurfactantes. Bueno et al.<sup>30</sup> isolou uma cepa de *Bacillus pumilus* de um solo contaminado por hidrocarboneto, que foi capaz de degradar o petróleo bruto e apresentar atividade bacteriostática e fungistática.

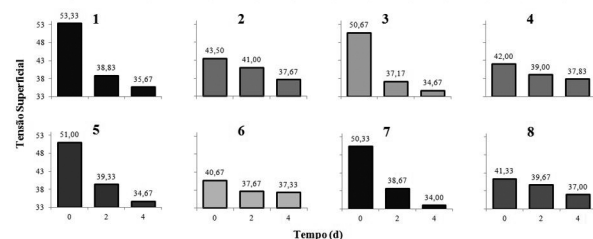
Em um trabalho realizado por Bento et al.<sup>38</sup> foram caracterizados biossurfactantes produzidos por populações microbianas de solos dos Estados Unidos e da China, contaminados com óleo diesel. Dentre as bactérias produtoras, o *Bacillus pumilus* foi a bactéria que reduziu significativamente a tensão superficial e aumentou a emulsificação do diesel em 59%. Os biossurfactantes produzidos por *Bacillus pumilus* em amostra isolada a partir de resíduos de óleo demonstraram ser esta bactéria um agente promissor para aplicação ambiental.<sup>39</sup>

### Estudo de meio para aumento da produção

Nas Figuras 3 e 4 encontram-se os resultados de tensão superficial dos meios de cultivo nos tempos inicial, 2 d e 4 d de fermentação com as bactérias *Pseudomonas* e *Bacillus*.



**Figura 3.** Tensão superficial dos meios livres de células para a produção de biossurfactantes em fermentação submersa por *Pseudomonas*



**Figura 4.** Tensão superficial dos meios livres de células para a produção de biossurfactantes em fermentação submersa por *Bacillus*

A Tabela 3 apresenta o percentual de redução da tensão superficial juntamente com o desvio padrão para as bactérias *Pseudomonas* e *Bacillus* tempos 2 d e 4 d, calculado de acordo com a Equação 5.

$$\text{Percentual de Redução} = \frac{\text{Tensão superficial}_{\text{inicial}} - \text{Tensão superficial}_{\text{final}}}{\text{Tensão superficial}_{\text{inicial}}} \quad (5)$$

Segundo Cooper e Paddock,<sup>40</sup> um organismo é considerado promissor produtor de biossurfactante quando produz compostos tensoativos com tensão superficial inferior a 40 mN/m, sendo que ambos os microrganismos estudados neste trabalho possibilitaram a redução das tensões superficiais dos meios a valores inferiores a este. Todavia, para um biossurfactante ser considerado eficiente é necessário que este valor esteja abaixo de 35 mN/m. Para estes experimentos, somente a bactéria *Bacillus* atingiu este valor.

**Tabela 3.** Percentual de redução da tensão superficial para *Pseudomonas* e *Bacillus* no tempo de 2 d e 4 d

Experimento	% Redução da tensão superficial em 2 d de bioprocesso		% Redução da tensão superficial em 4 d de bioprocesso	
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i>
	1	7,95±1,05	27,78±0,69	20,86±2,27
2	2,17±1,26	4,65±1,08	11,59±4,22	11,63±1,67
3	2,68±1,01	27,45±1,41	10,74±0,42	31,37±0,36
4	5,22±0,42	4,88±2,96	7,46±3,48	7,32±2,27
5	1,44±0,41	21,57±1,13	8,63±0,09	31,37±1,13
6	5,07±1,10	7,50±0,10	15,22±0	5,00±2,74
7	4,20±1,18	24,00±1,04	6,29±1,16	32,00±0,77
8	4,41±1,27	4,88±1,37	8,82±1,26	9,76±1,24

Verificou-se a diminuição da tensão superficial do meio no decorrer do tempo de fermentação para as duas bactérias estudadas (Figuras 3 e 4), o que indica a produção de compostos tensoativos no meio de cultivo. A maior redução tanto para *Pseudomonas* como para *Bacillus* ocorreu no experimento 1, porém, a redução da tensão superficial para *Pseudomonas* foi de 20% enquanto que para o *Bacillus* foi na ordem de 33%, obtendo-se tensão superficial final de 35,67 mN/m.

### Análise estatística do efeito das variáveis sobre a redução da tensão superficial

Os resultados da análise estatística dos dados de produção de biossurfactantes pela *Pseudomonas* estão apresentados nas Tabelas 4 e 5. A Tabela 4 apresenta a análise de variância dos dados de redução da tensão superficial em 4 d de fermentação (em comparação com o tempo inicial) em função das variáveis indutor, concentração de indutor e presença da fonte de nitrogênio. A Tabela 5 apresenta os efeitos estimados das variáveis e os coeficientes de regressão do modelo matemático que representa a tensão superficial em função das variáveis.

Verifica-se que todas as variáveis estudadas apresentaram efeitos principais negativos, o que significa que a maior redução na tensão superficial dos meios ocorreu nos níveis inferiores das variáveis, ou seja, com óleo de soja como indutor na concentração de 1% e sem a fonte de nitrogênio.

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) do modelo matemático (Equação 6), que é uma medida de qualidade do modelo em relação à sua habilidade de estimar corretamente os valores da variável resposta, foi de 0,83, validando a superfície de resposta apresentada na Figura 5.

$$RTS = 11,94 - 0,45.X_1 + 3,40.X_2 - 1,55.X_3 + 0,07.X_1.X_2 + 2,73.X_1.X_3 + 0,87.X_2.X_3 \quad (6)$$

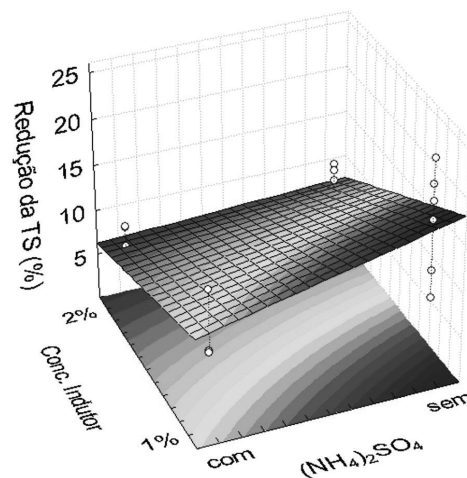
Os resultados da análise estatística dos dados de produção de biossurfactantes pelo *Bacillus* estão apresentados nas Tabelas 6 e 7.

**Tabela 4.** Análise de variância dos dados de redução da tensão superficial em 4 d de fermentação em comparação com o tempo inicial em função das variáveis do Planejamento Fatorial Completo  $2^3$  para a *Pseudomonas*

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor F	Nível de significância (p)
(X <sub>1</sub> ) Indutor	4,860	1	4,860	0,785	0,388
(X <sub>2</sub> ) Conc. indutor	277,796	1	277,796	44,89	0,000
(X <sub>3</sub> ) Presença de sulfato de amônio	58,264	1	58,264	9,413	0,007
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	0,125	1	0,125	0,020	0,889
X <sub>1</sub> .X <sub>3</sub>	179,230	1	179,230	28,96	0,000
X <sub>2</sub> .X <sub>3</sub>	18,420	1	18,420	2,976	0,103
Erro	105,226	17	6,189		
Soma dos quadrados totais	643,922	23			

**Tabela 5.** Efeitos estimados das variáveis e coeficientes de regressão do modelo matemático que representa a redução da tensão superficial em função das variáveis na produção de biossurfactantes por *Pseudomonas*

Fonte de variação	Efeitos estimados	Coefficientes de regressão	Nível de significância (p)
Média	10,947	10,947	0,000
(X <sub>1</sub> ) Indutor	-0,900	-0,450	0,388
(X <sub>2</sub> ) Conc. indutor	-6,804	-3,402	0,000
(X <sub>3</sub> ) Presença de sulfato de amônio	-3,116	-1,558	0,007
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	0,144	0,072	0,889
X <sub>1</sub> .X <sub>3</sub>	5,465	2,732	0,000
X <sub>2</sub> .X <sub>3</sub>	1,752	0,876	0,103



**Figura 5.** Superfície de resposta da redução da tensão superficial dos meios considerando os resultados de 4 d de fermentação em comparação com o tempo inicial para a bactéria *Pseudomonas* em função da presença de sulfato de amônio e da concentração de indutor

A Tabela 6 apresenta a análise de variância dos dados de redução da tensão superficial em 4 d de fermentação em comparação com o tempo inicial em função das variáveis indutor, concentração de indutor e presença da fonte de nitrogênio. A Tabela 7 apresenta os efeitos

estimados das variáveis e os coeficientes de regressão do modelo matemático que representa a tensão superficial em função das variáveis.

**Tabela 6.** Análise de variância dos dados de redução da tensão superficial em 4 d de fermentação em comparação com o tempo inicial em função das variáveis do Planejamento Fatorial Completo  $2^3$  para a *Bacillus*

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor F	Nível de significância (p)
(X <sub>1</sub> ) Indutor	2854,334	1	2854,334	1066,71	0,000
(X <sub>2</sub> ) Conc. indutor	2,050	1	2,050	0,766	0,394
(X <sub>3</sub> ) Presença de sulfato de amônio	8,932	1	8,932	3,338	0,085
X <sub>1</sub> ,X <sub>2</sub>	0,003	1	0,003	0,001	0,973
X <sub>1</sub> ,X <sub>3</sub>	7,296	1	7,296	2,727	0,117
X <sub>2</sub> ,X <sub>3</sub>	22,685	1	22,685	8,478	0,009
Erro	45,489	17	2,676		
Soma dos quadrados totais	2940,789	23			

**Tabela 7.** Efeitos estimados das variáveis e coeficientes de regressão do modelo matemático que representa a redução da tensão superficial em função das variáveis na produção de biossurfactantes por *Bacillus*

Fonte de variação	Efeitos estimados	Coefficientes de regressão	Nível de significância (p)
Média	21,388	21,388	0,000
(X <sub>1</sub> ) Indutor	-21,811	-10,905	0,000
(X <sub>2</sub> ) Conc. indutor	-0,584	-0,292	0,394
(X <sub>3</sub> ) Presença de sulfato de amônio	-1,220	-0,610	0,0853
X <sub>1</sub> ,X <sub>2</sub>	-0,023	-0,011	0,973
X <sub>1</sub> ,X <sub>3</sub>	-1,103	-0,551	0,117
X <sub>2</sub> ,X <sub>3</sub>	1,944	0,972	0,009

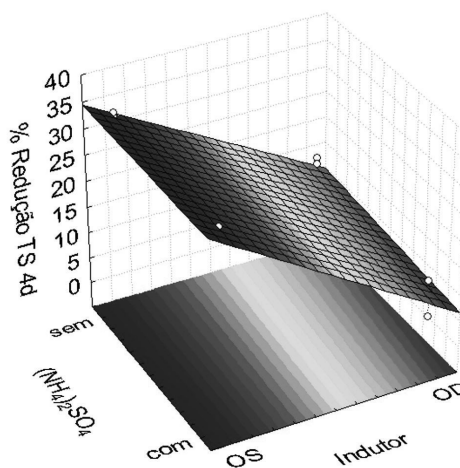
Assim como para os resultados obtidos com a *Pseudomonas*, nas fermentações com o *Bacillus* verificou-se que todas as variáveis estudadas apresentaram efeitos principais negativos, o que significa que a maior redução na tensão superficial dos meios ocorreu com óleo de soja como indutor na concentração de 1% e sem a adição da fonte de nitrogênio.

O R<sup>2</sup>, do modelo matemático (Equação 7) foi de 0,98, validando as superfícies de resposta apresentadas na Figura 6.

$$RTS = 21,38 - 10,95.X_1 + 0,29.X_2 - 0,61.X_3 - 0,01.X_1.X_2 - 0,55.X_1.X_3 + 0,97.X_2.X_3 \quad (7)$$

A variável adição da fonte de nitrogênio somente foi expressiva considerando-se um intervalo de confiança de 90%. Verificou-se (Figura 6) que o óleo de soja foi o indutor que possibilitou a maior redução da tensão superficial.

O óleo de soja foi utilizado como indutor na produção de biossurfactantes em trabalhos realizados por outros autores, como Lima et al.,<sup>41</sup> que produziram biossurfactantes por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando diferentes concentrações de óleo de soja residual, nitrato de amônio e levedura cervejeira residual. A produção de biossurfactante foi monitorada, sendo que as linhagens foram capazes de reduzir a tensão superficial para 26 mN/m na concentração de 1,5% de óleo de soja e 0,1% de nitrato de amônio.



**Figura 6.** Superfície de resposta da redução da tensão superficial dos meios considerando os resultados de 4 d de fermentação em comparação com o tempo inicial para a bactéria *Bacillus* em função da presença de sulfato de amônio e da concentração de indutor

Oliveira<sup>42</sup> objetivou verificar a produção de biossurfactante pela bactéria *Bacillus pumilus* utilizando glicose, sacarose, vinhaça, óleo residual de fritura e melaço como substrato e avaliar o potencial para aplicação na biorremediação envolvendo óleo residual de fritura. Ainda, segundo Saharan, Sahu e Sharma,<sup>43</sup> o resíduo proveniente de fritura de alimentos se apresenta como uma fonte alternativa de carbono de baixo custo podendo ser utilizado para a produção de biossurfactantes.

O óleo de soja apresentou melhores resultados na redução da tensão superficial que o óleo diesel ( $p < 0,05$ ) como indutor da produção de biossurfactantes. Isto pode ser explicado pelo óleo de soja ser constituído por estruturas orgânicas simples (ácidos graxos, cuja cadeia contém 8 a 20 átomos de carbono), mais facilmente metabolizáveis que os compostos constituintes do óleo diesel (mistura complexa de centenas de hidrocarbonetos constituídos por 8 a 40 átomos de carbono e hidrogênio e, em menor quantidade, por substâncias cuja fórmula química contém átomos de enxofre, nitrogênio, metais, oxigênio e outros).<sup>44</sup>

O óleo de soja pode ter sido primeiramente hidrolisado por lipases produzidas pelos microrganismos, sendo transformados em glicerol e ácidos graxos. O glicerol formado, por sua vez, pode ser esterificado com ácidos graxos livres,<sup>45</sup> possibilitando a biossíntese de glicolipídios de baixo peso molecular, semelhantemente ao que ocorre nas reações de síntese orgânica de biossurfactantes com lipases.

Por outro lado, os ácidos graxos oriundos da hidrólise do óleo de soja podem ser utilizados como substrato para a síntese da fração lipídica dos biossurfactantes, sendo metabolizados a partir da  $\beta$ -oxidação e reutilizados para a síntese de bioemulsificantes, como mencionado por Kitamoto et al.<sup>46</sup>

Já a metabolização do óleo diesel pode ter sido dificultada pelo fato dos hidrocarbonetos presentes no óleo diesel serem de mais difícil utilização para a síntese dos biossurfactantes. Em comparação, os hidrocarbonetos de cadeia linear (alcanos, alcenos) primeiramente precisam ser convertidos a alcoóis, aldeídos e posteriormente a ácidos graxos, para somente depois serem convertidos pela  $\beta$ -oxidação.<sup>47</sup> Já a utilização dos compostos aromáticos como os HPAs e BTEX, presentes no óleo diesel, envolve a conversão do substrato aromático em um metabólito como o catecol, com posterior abertura do anel por enzimas denominadas dioxigenases e conversão a compostos como acetil-CoA, oxalato e piruvato, os quais são intermediários do processo respiratório.<sup>48</sup>

Em relação à influência da adição de sulfato de amônio no meio de cultivo, em nosso trabalho os melhores resultados de redução da tensão superficial foram obtidos na ausência deste. Já no trabalho de Rocha *et al.*,<sup>49</sup> a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 foi utilizada para a produção de biossurfactantes em suco de caju adicionado de óleo de soja e diferentes fontes de nitrogênio (peptona, NaNO<sub>3</sub>, e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), sendo que a peptona foi vantajosa em relação ao nitrato de sódio e sulfato de amônio, obtendo-se reduções da tensão superficial de até 41%, com tensões superficiais finais de 29,50 mN/m.

Santa Anna *et al.*<sup>50</sup> utilizaram como fontes de nitrogênio o NaNO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O para a produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* e demonstraram que o nitrato de sódio foi melhor que o sulfato de amônia e a uréia. O resultado foi explicado pelo fato da assimilação do nitrato envolver a redução até amônio e posterior assimilação através da via glutamina-glutamato, o que significa que a assimilação desta fonte de nitrogênio é mais lenta, indo ao encontro da limitação de nitrogênio necessária para a síntese de biossurfactantes.

A literatura indica que a produção de biossurfactantes ocorre na limitação da fonte de nitrogênio. Quando a limitação por nutrientes inicia, o crescimento microbiano diminui, mas a fonte de carbono continua sendo transportada às células para a biossíntese de lipídios. Os produtos finais formados podem ser lipídios, polissacarídeos e polímeros de estocagem como o poli-hidroxibutirato. Os nutrientes limitantes podem ser o nitrogênio, ferro, magnésio e fósforo.<sup>16</sup> Este comportamento, de maior produção de biossurfactantes na limitação de nitrogênio, foi o mesmo observado em nosso trabalho.

As bactérias do gênero *Bacillus* requerem a adição de fontes de nitrogênio no meio de cultivo visto que os biossurfactantes que produzem são principalmente do tipo lipopetídios, a fim de compor a parcela da estrutura do biossurfactante composta pelos peptídios. Cabe mencionar, entretanto, que o meio de cultivo utilizado neste trabalho para a produção dos biossurfactantes continha o extrato de levedura como componente, o qual também é considerado uma fonte de nitrogênio.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com a literatura em relação à produção de biossurfactantes pelos microrganismos *Pseudomonas* e *Bacillus*, demonstrando o potencial de produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de locais contaminados com resíduos oleosos, dado o importante papel destas biomoléculas nos processos de metabolização de estruturas lipídicas e, portanto, na sua biodegradação. Estes microrganismos são promissores para a viabilização do uso comercial dos biossurfactantes, quando produzidos em meios de baixo custo e na presença de indutores, podendo contribuir na redução do custo dos biossurfactantes, principal barreira ao seu uso em maior escala.

## CONCLUSÃO

Os microrganismos selecionados como produtores de emulsificantes foram identificados como sendo dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*.

No estudo de meio de cultivo para a produção de biossurfactantes por ambos os microrganismos, os melhores resultados de redução de tensão superficial foram encontrados utilizando 1% de óleo de soja como indutor e sem a adição de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Os microrganismos estudados foram capazes de reduzir a tensão superficial dos meios de fermentação para 34 mN/m (*Bacillus*) e 39 mN/m (*Pseudomonas*). Os resultados de produção de biossurfactantes por estas cepas são promissores, corroborando com a literatura que menciona que cepas microbianas isoladas de solos contaminados com resíduos oleosos são potenciais produtoras destes compostos.

## REFERÊNCIAS

- Berger, T. M.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2005.
- Pereira, A.R.B.; Freitas, D. A. F. de; *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*. **2012**, 6, 975.
- Abdel-Mawgound, A. M.; Lépine, D. E.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, 86, 1323.
- Bezerra, M. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil, 2006.
- Rossmann, M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 2008.
- Pirrólo, M. P. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual Paulista, Brasil, 2006.
- Matsuura, A. B. J.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004.
- Faria, A. F. de.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2010.
- Ron, E. Z.; Rosenberg, E.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 3, 249.
- Fiechter, A.; *Trends Food Sci. Technol.* **1992**, 31, 283.
- Barros, F. F. C.; Quadros, C. P. de; Marostica Junior, M. R.; Pastore, G. M.; *Quim. Nova* **2007**, 2, 409.
- Kim, S. H.; Lim, E. J.; Lee, S. O.; Lee, J. D.; Lee, T. H.; *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2010**, 31, 249.
- Brown, M. J.; *Int. J. Cosmet. Sci.* **1991**, 13, 61.
- Bognolo, G.; *Colloids Surf.* **1999**, 152, 41.
- Mori, T.; Kondo, R.; *FEMS Microbiol. Lett.* **2002**, 213, 127.
- Desai, J. D.; Banat, I. M.; *Microbiol Mol. Biol. Rev.* **1997**, 61, 47.
- Colla, L. M.; Costa, J. A. V.; *Vetor* **2003**, 13, 85.
- Souza, M.; Melo, M. M. V.; Rodrigues, S.; Sant'ana, H. B.; Gonçalves, L. R. B.; *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **2012**, 35, 897.
- Lima, A. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1997.
- Nitschke, M.; Pastore, G. M.; *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* **2003**, 31, 63.
- Arakaki, A.H.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2010.
- Oliveira, S. J.; *Microbiologia Veterinária: Guia Bacteriológico Prático*, 5<sup>th</sup> ed., Ulbra: Canoas, 2000.
- Oplustil, C. P.; Zoccolli, C. M.; Tobouti, N.R.; Sliinto, S.I.; *Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica*, 2<sup>th</sup> ed., Sarvier: São Paulo, 2004.
- Martins, V.G.; Kalil, S. J.; Bertolin, T. E.; Costa, J. A. V.; *Z. Naturforsch.* **2006**, 61c, 721.
- George, S.; Raju, V.; Subramanian, T. V.; Jayaraman, K.; *Bioprocess Eng.* **1997**, 16, 381.
- Rodrigues, E.; Tochetto, L.; Morais, V. Q. de; Reinehr, C. O.; Bertolin, T. E.; Colla, L. M.; *Resumos do 18º Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Caxias do Sul, Brasil, 2010.
- Bortoluzzi, L.; Pazzini, B. P.; Reinehr, C. O.; Bertolin, T. E.; Colla, L. M.; *Resumos do 18º Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Caxias do Sul, Brasil, 2010.
- Pinto, M. H.; Martins, R. G.; Costa, J. A. V.; *Quim. Nova* **2009**, 8, 2104.
- Martins, G. V.; Kalil, S. J.; Costa, J. A. V.; *Quim. Nova* **2008**, 8, 1942.
- Bueno, S. M.; Silva, A. N.; Garcia – Cruz, C. H.; *Quim. Nova* **2010**, 7, 1572.
- [http://www.cefar.com.br/download/jornal%2031ed%20\(3\).pdf](http://www.cefar.com.br/download/jornal%2031ed%20(3).pdf), acessada em Novembro 2012.
- Palleroni, N. J.; *Microbiology and Microbial Infection. Systematic Bacteriology*; Collier, L. Ballows, A., Sussman, M., eds.; Topley & Wilson's: New York, 1998.
- Trabulsi, L. R.; Alterthum, F.; *Microbiologia*, 4<sup>th</sup> ed., Atheneu: Rio de Janeiro, 2005.

34. Bergey's D.; *Manual of the Determinative Bacteriology*. 2<sup>nd</sup> Night Edition: Philadelphia, 1989 - 2000.
35. Lozada, J. P. C.; *Trabalho de Graduação*, Universidade Nacional de Colômbia, Colômbia, 2010.
36. Sirtori, L. R.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.
37. Rocha, M. V. P.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2007.
38. Bento, F. M.; Camargo, F. A. O.; Okeke, B.; *Braz. J. Microbiol.* **2003**, *34*, 65.
39. Calvo, C.; Manzanera, M.; Silva-castro, G. A.; Uad, I.; González-López, J.; *Sci. Total Environ.* **2009**, *12*, 3634.
40. Cooper, D.G.; Paddock, D. A.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1984**, *1*, 173.
41. Lima, C. J. B. de; Sérvulo, E. F. C.; Cardoso, V. L.; *Ciência & Engenharia.* **2007**, *1/2*, 73.
42. Oliveira, J. G. de; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Brasil, 2010.
43. Saharan, B.S.; Sahu, R. K.; Sharma, D.; *Genet. Eng. Biotechnol. J.* **2011**, GEBJ-29. Disponível em <http://astonjournals.com/manuscripts/ Accepted/GEBJ-29acc7-11-11.pdf>, acessada em Abril 2013.
44. Silva, M. V. I.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2006.
45. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L.; *Biochemistry*, 5<sup>th</sup> ed., W. F. Freeman: New York, 2006.
46. Kitamoto, D.; Isoda, H.; Nakahara, T.; *J. Biosci. Bioeng.* **2002**, *3*, 187.
47. Fritsche, W.; Hofrichter, M.; Em: *Biotechnology: environmental processes II*; Jördening, H. J. Winter, J., eds.; Published Online, 2005.
48. Lemos, J. L. S.; Oliveira, S. D.; Barros, C. A.; Schlittler, L. A. F. S.; *Diálogos e Ciência.* **2009**, *11*, 79.
49. Rocha, M. V. P.; Mendes, J. S. Giro, M. E. A; Gonçalves, L. R. B.; *Resumos do 4º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás*, Campinas, São Paulo, 2007.
50. Santa Anna, L.M.; Sebastian, G. V.; Menezes, E. P.; Alves, T. L. M.; Santos, A. S.; Pereira, Jr., N.; Freire, D.M.G.; *Braz. J. Chem. Eng.* **2002**, *2*, 159.