



AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus*

Renata Kelly Pereira da Silva¹; Sharline Florentino de Melo Santos²; Andrea Farias de Almeida³; Paulo Victor Sarmento Dias⁴; Maria Helena Juvito da Costa⁵

¹ Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Engenharia Química – r.kelly@hotmail.com

² Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Engenharia Química – sharlinefm@hotmail.com

³ Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Biotecnologia (DB) – andreaafalm@cbiotec.ufpb.br

⁴ Universidade de São Paulo, Departamento de Engenharia Química – ppaulo_dias@yahoo.com.br

⁵ Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Engenharia Química – helenajuvito@gmail.com

RESUMO

Os biossurfactantes são uma opção frente a sua homóloga de origem química, surfactante, suas vantagens vão além de ser biodegradável e renovável. A partir do desenvolvimento de novas metodologias para se obter uma maior produtividade utilizam-se como fonte de carbono resíduos industriais, diminuindo os custos de produção e diminuindo o descarte no meio ambiente de um grande volume de material não antes utilizado. O objetivo desse trabalho foi testar dois micro-organismos em que um já é sabido que produz biossurfactante, *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) e a outra foi isolada de um solo de cultivo de uma usina de açúcar e álcool, *Bacillus pumilus*, a fonte de carbono foi a glicose, e o cultivo se fez em mesa rotatória de 200 rpm à 30C por 48 horas. Como resultado, foi obtido uma concentração máxima de biomassa de 0,4 g/L para o UFPEDA 86 e 0,6 g/L para o *Bacillus pumilus*. Em relação ao índice de emulsificação obteve-se em média 30%.

Palavras-chave: Biossurfactantes, Bactérias, Bacillus.

1. INTRODUÇÃO

Biossurfactantes são agentes tensoativos biológicos, produzidos por microrganismos, plantas e animais, incluindo os seres humanos [Al-Wahaibi et al., 2014].

Surfactantes químicos e biossurfactantes podem aumentar a solubilidade de componentes de petróleo na água. Os surfactantes são eficazes na redução das tensões interfaciais de óleo e de água in situ e também pode reduzir a viscosidade do óleo e remover a água do óleo antes do processamento. Biossurfactantes podem ser tão eficazes como os agentes tensoativos químicos sintéticos e para certas aplicações que

têm vantagens, tais como uma elevada especificidade. A maioria dos biossurfactantes e muitos tensoativos químicos utilizados para fins de biorremediação são biodegradáveis. [Singh, et al., 2007]

A utilização de microrganismos e produtos microbianos para a degradação de poluentes e tal tecnologia, denominada biorremediação [Silva, et al., 2014].

Biorremediação petróleo é efectuada por microrganismos capazes de utilizar os hidrocarbonetos como fonte de energia e carbono. Estes microrganismos são onipresentes na natureza e são capazes de degradar os vários tipos de hidrocarbonetos - de cadeia curta, de cadeia longa e vários compostos



aromáticos, incluindo os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. [Ron et al., 2002]

O fato de que biossurfactantes ter uma origem biológica implica uma melhor biocompatibilidade e boa biodegradabilidade microbiana; conseqüentemente, existe grande número de potenciais aplicações para este tipo de surfactantes. Esta origem biológica é de grande interesse, especialmente quando há grande interferência com o meio ambiente, por exemplo, para a recuperação de petróleo terciário, para a descontaminação de áreas poluídas por petróleo, para a proteção das culturas [Calvo et al., 2009].

Em comparação com os agentes tensoativos de síntese química, biossurfactantes tem a vantagem de menor toxicidade e maior biodegradabilidade, e elas também mantêm as suas propriedades de superfície ativa em condições extremas de temperatura, pH e da salinidade [Slivinski, et al., 2012].

Os riscos ambientais envolvidos no derramamento de óleo em associação com metais pesados têm aumentado e poucas tecnologias são capazes de lidar com os efeitos de ambos os contaminantes simultaneamente. Biossurfactantes pode ser utilizado para a remoção de ambos os contaminantes orgânicos e de metais e apresentam comportamento semelhante para aumentar a sua solubilidade em água, o que facilita a sua remoção por biodegradação ou rubor. [França, et al., 2015]

Atualmente a disponibilidade de grandes quantidades biossurfactantes comercialmente é limitada pois o custo de produção de biossurfactante em grandes quantidades é ainda elevada. Vários investigadores têm sugerido a aplicação de métodos de otimização estatísticos ou a utilização de matérias-primas mais baratas, tais como subprodutos agroindustrial para reduzir o custo de produção (YAHYA ET AL., 2014). A maioria dos surfactantes é sintetizada a

partir do petróleo, o que lhes confere características não biodegradáveis (NITSCHKE ET AL., 2002).

Entre os diferentes biossurfactantes e micro-organismos que produzem, a produção de biossurfactantes lipopeptídeos, na sua maioria produzidos por *Bacillus* sp., É destacado devido ao seu interesse comercial e considerável eficiência [França, et al., 2015].

O interesse em biossurfactantes tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, à medida que são potenciais candidatos para muitas aplicações comerciais nos setores do petróleo, produtos farmacêuticos, indústrias de processamento de alimentos e biomédicas [Rodrigues et al., 2006].

Nesse sentido, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de comparar dois micro-organismos *Bacillus subtilis* (proveniente de uma cultura,) e *Bacillus pumilus* (isolado de um solo) quanto a produção de biossurfactante utilizando um meio de baixo custo utilizando glicose como fonte de carbono.

2. METODOLOGIA

2.1. Micro-organismo Os microrganismos utilizados no presente estudo são do gênero *Bacillus*, sendo o *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) da Coleção de Microrganismos – UFPEDA do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco e o *Bacillus pumilus* isolado do solo cultivado de cana de uma usina da região. As culturas foram mantidas no meio Luria-Bertani Broth (LB) a 4°C composto por Ágar(20 g/L),Peptona (10 g/L), Extrato de levedura (5 g/L), Cloreto de sódio (10 g/L).

2.2. Pré-inóculo e Inóculo

O pré-inóculo foi preparado colocando três alçadas da cepa em um



tubo de ensaio contendo 5 mL do meio de cultivo proposto por Pacheco (2008). O meio foi constituído por KH_2PO_4 (2 g/L); K_2HPO_4 (2 g/L); NaNO_3 (3,4 g/L), NaCl (1,0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,02 g/L); $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g/L), Glicose (10 g/L). Os tubos foram incubados em mesa agitadora a 30 °C e 200 rpm por 8 h.

O inóculo foi preparado em 15 mL do mesmo meio utilizado para o pré-inóculo, sendo inserido a ele os 5 mL do pré-inóculo e foi incubado nas mesmas condições por 24 h.

2.3. Produção de Biossurfactante

A produção de biossurfactantes para foi realizada em elernmeyer de 500 mL contendo 200 mL do mesmo meio usado para o inóculo. O mei de cultura foi esterilizado por 15 min, 1 atm e 121°C, após o resfriamento o inóculo foi adicionado ao meio para o crescimento bacteriano e mantido por 48 horas em mesa rotatória a 200 rpm e temperatura 30°C. Foram retiradas amostras em intervalos de tempo regular para a análise do índice de emulsificação e crescimento microbiano. Os ensaios foram realizados em duplicata.

2.4. Análises

2.4.1. Crescimento Microbiano

O crescimento microbiano foi determinado pelo método de massa seca, equação 1. Foi retirada uma amostra de 2 mL do cultivo e centrifugada a 10000 rpm por 5 minutos, depois de retirar o sobrenadante foi posto para secar na estufa a 105°C por 24 horas, após esse período os tubos foram colocados no dessecador por 15 minutos e depois de frio pesados. O sobrenadante foi utilizado para análise do índice de emulsificação.

$$X = \frac{\text{peso}_{\text{umido}}(\text{g}) - \text{peso}_{\text{seco}}(\text{g})}{\text{volume}_{\text{utilizado}}(\text{L})} \quad [1]$$

2.4.1. Índice de Emulsificação

O índice de emulsificação foi realizado usando 2,0 mL do sobrenadante de cultura fermentado livre de células e então foram colocados em tubo de ensaio, adicionou-se o mesmo volume de óleo de soja. Agitou-se em agitador vórtex por 2 minutos, em alta rotação. O índice de emulsificação foi calculado através da razão entre a altura da região emulsificada e altura total após 24 horas, de acordo com a equação 2 proposta por Wei *et al.*, 2005. O teste do índice de emulsificação foi realizado em duplicata.

$$IE(\%) = \frac{H_{FE}}{H_{TOTAL}} \times 100 \quad [2]$$

Sendo H_{FE} a altura da fase emulsionada e H_{TOTAL} a altura total da solução.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Crescimento Microbiano

As bactérias analisadas apresentaram crescimento lento no meio proposto por Pacheco (2008). Este meio utiliza glicose como fonte de carbono e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. O crescimento para o *Bacillus pumilus* e mostrado na Figura 1. A concentração de células permaneceu praticamente constante nas primeiras 24 horas de cultivo, chegando a concentração de 0,6 g/L, em 48 horas de cultivo. É possível observar que o tempo de cultivo foi pequeno, ou seja, é provável que bactéria iria continuar crescendo após este período.

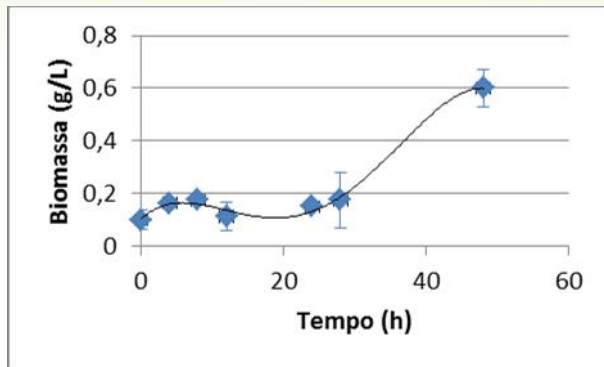


Figura 1 : Curva de crescimento do *Bacillus pumilus*.

O crescimento para a cepa *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) foi menor que para o *B. pumilus* levando em consideração que a concentração máxima de células obtida, em 48 horas de cultivo foi 0,4 g/L, Figura 2. Como a produção de biossurfactantes na grande maioria dos casos, é associada ao crescimento dos microrganismos é necessário avaliar o crescimento das linhagens em estudo em outros meios de cultivo, com outras fontes de carbono e nitrogênio.

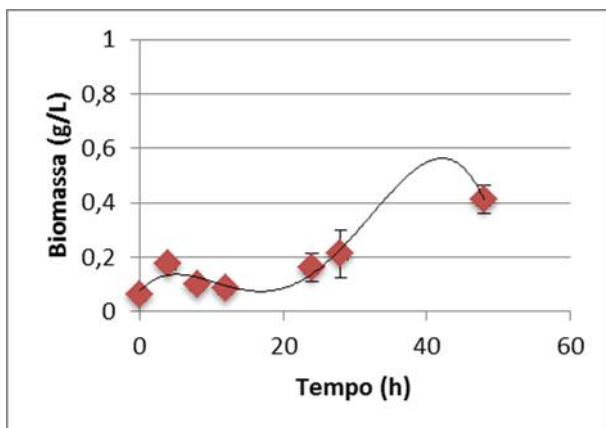


Figura 2 : Curva de crescimento do *Bacillus Subtilis* (UFPEDA 86).

3.2. Índice de emulsificação

Uma boa previsão da produção do biossurfactante é através do índice de emulsificação, devido à baixa produção de biomassa durante o cultivo de ambas

as cepas de *Bacillus* é esperado que esse resultado também seja diferente do esperado. O índice máximo de emulsificação foi de 34,5% para o *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) para o período de 24 horas, Figura 3.

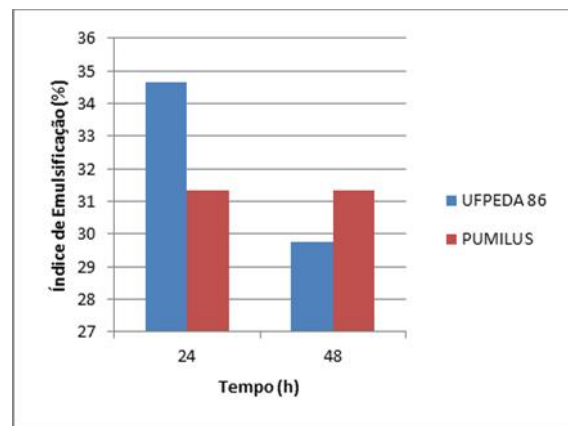


Figura 3 - Índice de emulsificação para os dois micro-organismos em 24 e 48 horas utilizando óleo de girassol.

De modo ilustrativo a figura 4 mostra, para o tempo de 48 horas, a camada emulsificada para os dois micro-organismos.



Figura 4: Índice de emulsificação para 48h.

A glicose e sacarose foram relatados como melhores fontes de carbono para o crescimento, utilizando diferentes isolados de *Bacillus* [Abdel-Mawgoud, et al., 2008]. Como no presente estudo o crescimento foi lento é necessário investigar outros meios de cultivo.



Os resultados encontrados para o índice de emulsificação e biomassa estão condizente com os relatados por Pereira et. al. (2013), nesse trabalho foi utilizado o meio que consistia em NaCl (10,0 g/L), Na₂HPO₄ (5,0 g/L), KH₂PO₄ (2,0 g/L), MgSO₄ 7H₂O (0,2 g/L) com diferentes fontes de carbono e fontes de nitrogênio. Dentre as fontes de carbono estão o acetato de sódio (AC), citrato de sódio (IC), frutose (FRU), glucose (GLU), glicerol (GLY), n-hexadecano (HEX), lactose (ALC), extrato de carne (ME) e parafina adicionados com uma concentração de 10 (g/L).

As fontes de nitrogênio testadas foram o citrato de amônio (AC), o nitrato de amônio (AN), sulfato de amônio de (AS), extrato de carne (ME), nitrato de sódio (SN), triptona (Tentar), uréia (U) e extrato de levedura (YE), as diferentes fontes de nitrogênio foram adicionadas a uma concentração de 2 (g/L). O que difere entre os meios são três componentes o K₂HPO₄ (2 g/L); CaCl₂.2H₂O (0,02 g/L); FeCl₃.7H₂O (0,001 g/L), e a concentração do NaCl que é dez vezes maior que o utilizado nesse trabalho.

As culturas foram incubadas a 40° C, sem agitação por 120 h. Os resultados obtidos quando se utilizou a glucose como fonte de carbono para a biomassa foi de 0,778 ± 0,091 e índice de emulsificação de 35,3 ± 1,7, assemelhando-se ao obtido nesse estudo.

4. CONCLUSÕES

As duas cepas analisadas *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) e *Bacillus pumillus* isolado do solo do cultivo de cana-de-açúcar são produtoras de biosurfactantes. É necessário estudos complementares sobre os meios de produção, bem como as condições de cultivo para se chegar em uma maior produção.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP –, da Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP – e do Ministério da Ciência e Tecnologia – MCT por meio do Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor Petróleo e Gás – PRH-ANP/MCT.



FINEP

FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA



Programa de
Recursos Humanos
da ANP



anp
Agência Nacional
do Petróleo,
Gás Natural e Biocombustíveis

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Mawgoud AM, Aboulwafa MM, Hassouna NAH. **Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5.** Appl Biochem Biotechnol 2008;150:305–25.

Al-Wahaibi, Y.; Joshi, S.; Al-Bahry, S.; Elshafie, A.; Al-Bemani, A.; Shibulal, B.; **Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery,** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Volume 114, 1 February 2014, Pages 324-333, ISSN 0927-7765.



Calvo, C.; Manzanera, M.; Silva-Castro, G.A.; Uad, I.; González-López, J. **Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects**, Science of The Total Environment, Volume 407, Issue 12, 1 June 2009, Pages 3634-3640, ISSN 0048-9697

França, I. W. L.; Lima, A. P.; Lemos, J. A. M.; Lemos, C. G. F.; Melo, V. M. M.; Sant'ana, H. B.; Gonçalves, L. T. B.; **Production of a biosurfactant by Bacillus subtilis ICA56 aiming bioremediation of impacted soils**, Catalysis Today, Available online 9 March 2015, ISSN 0920-5861,

Nitschke, M. M., et al. (2002), **Biossurfactantes: propriedades e aplicações**. Quim. Nova, vol. 25, p. 772-776.

Pacheco, G. J.; PEREIRA JR., N.; CAMMAROTA, M. C.. **Produção de biossurfactantes por Rhodococcus erythropolis e sua aplicação na remoção de óleo de sedimentos arenosos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Pereira, J. F. B.; Gudiña, E. J.; Costa, R.; Vitorino, R.; Teixeira, J. A.; Coutinho, J. A. P.; Rodrigues, L. R. **Optimization and characterization of biosurfactant production by Bacillus subtilis isolates towards microbial enhanced oil recovery applications**, Fuel, Volume 111, September 2013, Pages 259-268,

Rodrigues, L.R; Teixeira, J.A.; Oliveira, R. **Low cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria** Biochem Eng J, 32 (2006), pp. 135-142

Ron, E. Z.; Rosenberg, E. **Biosurfactants and oil bioremediation**. Journal: Current Opinion in Biotechnology, 2002, Volume 13, Number 3, Page 249

Silva, N. M. P. R.; Rufino, R. D.; Luna, J. M.; Santos, V. A.; Sarubbo, L. A. **Screening of Pseudomonas species for biosurfactant production using low-cost substrates**, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, Volume 3, Issue 2, April 2014, Pages 132-139, ISSN 1878-8181.

Singh, A.; Van Hamme, J.D. ; Ward, O.P. **Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects**, Biotechnol Adv, 25 (2007), pp. 99-121

Slivinski, C. T.; Mallmann, E., Araújo, J. M. A.; Mitchell, D. A.; Krieger, N. **Production of surfactin by Bacillus pumilus UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent**, Process Biochemistry, Volume 47, Issue 12, December 2012, Pages 1848-1855, ISSN 1359-5113.

WEI, Y.; CHOU, C.; CHANG, J. **Rhamnolipid production by indigenous Pseudomonas aeruginosa originating from petrochemical wastewater**. Biochemical Engineering Journal, v. 27, p. 146-154, 2005.

Yahya Al-Wahaibi, Sanket Joshi, Saif Al-Bahry, Abdulkadir Elshafie, Ali Al-Bemani, Biji Shibulal, **Biosurfactant production by Bacillus subtilis B30 and its application in enhancing oil recovery**, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Volume 114, 1 February 2014, Pages 324-333, ISSN 0927-7765,