

VI-070 - REUSO DE EFLUENTES INDUSTRIAS NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *SERRATIA MARCESCENS* UCP 1549

Thiago dos Santos Alves⁽¹⁾

Graduando em Química Industrial. Departamento de Química da Universidade Estadual da Paraíba(UEPB)

Isabelle Tribuzy Ferreira da Costa⁽²⁾

Graduanda em Engenharia Sanitária e Ambiental. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Jaqueline Perreira Salgado⁽³⁾

Graduanda em Engenharia Sanitária e Ambiental. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Rosileide Fontenele da Silva Andrade⁽⁴⁾

Bióloga. Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Doutoranda em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Helvia Walewska Casullo de Araújo⁽⁵⁾

Engenheira Química. Professora do Departamento de Química na Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Mestre em Desenvolvimento e Meio Ambiente. Doutora em Biotecnologia em Recursos Naturais na Universidade Estadual do Ceará(UECE).

Endereço⁽⁵⁾: Universidade Estadual da Paraíba; Rua Baraúnas, 351 - Bairro Universitário - Campina Grande-PB, CEP 58429-500- Brasil - Tel: (83) 3315- 3356 - e-mail: hwcasullo@ig.com.br

RESUMO

Biossurfactantes são moléculas anfipáticas capazes de diminuir a tensão superficial entre gases, líquidos e sólidos. O crescente interesse por este biopolímero deve-se a sua baixa toxicidade, biodegradabilidade e diversidade de aplicações. Entretanto, sua viabilidade comercial é ainda limitada pelos altos custos de produção, associados a métodos ineficientes de recuperação e uso de substratos oleosos. O presente trabalho teve como objetivo, o reaproveitamento de rejeitos industriais/comerciais (manipueira, parafina e óleo pós -fritura) como substratos de baixo custo na produção de um biossurfactante pela bactéria *Serratia marcescens* UCP 1549 e aplicar em areia contaminada com óleo queimado para observar o processo de bioremediação. O meio para a produção do biossurfactante foi constituído por: manipueira (6%), parafina (4%) e óleo vegetal pós-fritura (5%) como fontes de carbono e/ou nitrogênio sob agitação de 155rpm por 48 horas de cultivo a 28°C. Este tensoativo produzido foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 70mN/m para 33,10mN/m. O biossurfactante produzido por *Serratia marcescens* UCP (1549) foi eficiente no processo de biorremediação removendo 83% do óleo queimado de motor adsorvido em areia contaminada. Esses resultados indicam a viabilidade da produção de biossurfactante a partir de resíduos industriais/comerciais como meio de baixo custo e aplicação em processos ambientais.

PALAVRAS-CHAVE: Efluentes industriais, Biossurfactante, Bioremediação, *Serratia marcescens*.

INTRODUÇÃO

No mundo industrializado, a contaminação por compostos orgânicos tornou-se um dos maiores problemas a ser enfrentado. No século XXI, uma ampla variedade de substâncias tóxicas e perigosas tem sido introduzida no meio ambiente, em especial, aquelas decorrentes de despejos de efluentes industriais e as provenientes de acidentes envolvendo derrames de petróleo e seus derivados. Rizzo *et al.* (2006), afirmam que o aumento de problemas ligados à poluição ambiental acarretou, nos últimos anos, maior conscientização quanto à importância da restrição de lançamentos indiscriminados de poluentes e da necessidade de remediar esses locais impactados.

A conversão de resíduos para insumos, representa um novo fluxo de produtos para o âmbito industrial, com o diferencial de serem produtos descartados em certas atividades e transformados em matéria-prima (Luna *et al.* 2009).

Os emulsificantes são surfactantes que apresentam capacidade de formar e estabilizar emulsões. Os biossurfactantes são agentes anfipáticos de origem microbiana que possuem em sua estrutura uma região hidrofóbica e outra hidrofílica capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial. São produzidos por uma gama de micro-organismos como *Bacillus subtilis*, *Candida antártica*, *Acinetobacter radioresistens* e, particularmente, *Serratia marcescens* que produz um biossurfactante de natureza peculiar conhecido como serrawetina, (Urum e Pekdemir, 2004; Lima e Alegre, 2009).

Atualmente, as soluções mais frequente utilizadas para resolver problemas de derramamento de óleo compreendem a utilização de substâncias químicas dispersantes, coagulantes ou uso de redes de contenção de óleo. Contudo, essas práticas além de não serem muito eficientes, são de alto custo. Uma alternativa atraente é a biorremediação, que consiste na utilização de microrganismos, ou de seus produtos, capazes de degradar o petróleo e seus derivados. Geralmente, os micro-organismos atacam os poluentes com o auxílio de biossurfactantes, por eles produzidos (Lima, *et al.* 2010).

Essas substâncias de origem microbiana têm atraído grande atenção devido às suas características de biodegradabilidade, baixa toxicidade, aceitabilidade ecológica e habilidade de serem produzidas a partir de fontes renováveis e de baixo custo. Estas propriedades dos biossurfactantes os tornam adequados para várias aplicações industriais, como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases. Portanto, observa-se um aumento da biodisponibilidade de hidrocarbonetos poluentes, através da utilização de agentes surfactantes, que promovem a dessorção e a solubilização de hidrocarbonetos, facilitando assim, a assimilação pelas células microbianas (Castiglioni *et al.* 2009).

O reaproveitamento dos rejeitos industriais torna-se uma possível estratégia para reduzir os custos de produção dos biossurfactantes e carotenóides e, conseqüentemente, minimizar a poluição causada por esses rejeitos quando lançados no meio ambiente (Lima, *et al.* 2010).

A manipueira é um efluente gerado em grande escala na preparação da farinha de mandioca, podendo ser utilizado como um atrativo substrato para a produção de biossurfactante contendo 1,242mg/L de nitrogênio, 12,330 mg/L de carbono e demais sais (Barana, 2000).

A parafina é uma substância derivada do petróleo e apresenta como características alta pureza e brilho. São compostas de uma mistura de hidrocarbonetos saturados de alto peso molecular. Possuem seus átomos de carbono organizados em cadeias abertas, utilizando apenas ligações simples, podendo ser cadeias normais ou ramificadas (Piróllo, 2006).

Os óleos e gorduras são substâncias insolúveis em água (hidrofóbicas), de origem animal ou vegetal, formado predominantemente por ésteres de triacilgliceróis, produtos resultantes de esterificação entre o glicerol e ácidos graxos. Os triacilgliceróis são compostos insolúveis em água e em temperatura ambiente, possuem uma consistência de líquido para sólido. A reutilização de óleos vegetais residuais de processos de frituras de alimentos tem se mostrado atraente para a produção de biossurfactante, pois, reaproveitamento do óleo vegetal como fonte de carbono para as transformações microbianas após a sua utilização na cadeia alimentar resulta numa destinação alternativa a um resíduo da produção de alimentos (Moretto e Alves, 1998).

A ampliação da escala de produção de biossurfactante por *Serratia marcescens*, nas condições otimizadas e também a investigação do processo de remoção de óleo em solos contaminados, representa considerável contribuição à saúde pública e ao meio ambiente, tendo em vista a persistência e toxicidade dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos derivados do petróleo, em especial, o óleo diesel. Ressalta-se ainda, que a obtenção de produtos de origem natural possibilitará atingir um setor industrial crescente e promissor (Lima e Alegre, 2009).

Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo, produzir agentes emulsificantes por *Serratia marcescens* UCP 1549 em meio à base de manipueira, parafina e óleo vegetal pós-fritura, como substratos, na alternativa da produção de biossurfactantes coadjuvantes dos processos de redução da poluição por promover a minimização dos problemas ambientais causados pelos rejeitos industriais e aplicar em areia contaminada com óleo queimado para observar o processo de bioremediação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a bactéria *S. marcescens* UCP 1549, isolado do solo de cultivo de bananeiras do estado de Pernambuco pertencente ao Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB/PE) da Universidade Católica de Pernambuco- Brasil, mantida à 50°C em meio ágar nutriente.

Preparação do pré-inóculo

O pré-inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do meio Luria-Bertani (LB) (composição por L: 5 g NaCl, 5g de glicose, 10 g Triptona, 5 g extrato de levedura), inoculados com 1 mL da suspensão de células bacterianas de *S. marcescens* UCP 1549 e incubados a 28°C por 17 h sob agitação de 155 rpm.

Substratos

Foi utilizada para a produção do biossurfactante 6% de manipueira, 4% de parafina e 5% de óleo vegetal pós-fritura

Produção do Biossurfactante por *Serratia marcescens* UCP 1549

Os cultivos para a produção do biossurfactante por *S. marcescens*, UCP 1549 foram realizados em frascos de Erlenmeyers de 500mL de capacidade contendo 100ml do meio de produção constituído por: manipueira (6%), óleo vegetal pós-fritura (5%) e parafina (4%), adicionados a água destilada, e ajustado a pH 7,0 a esse meio foi adicionado 1ml do pré-inóculo acima citado contendo 10^7 de UFC/100mL de células viáveis. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 155rpm, incubados por 48h à temperatura de 28°C. O líquido metabólico foi submetido a aplicação da remoção do óleo motor em areia contaminada com óleo diesel queimado.

Potencial para biorremediação

A capacidade de remoção de óleo motor de areia contaminada foi testada através da mistura de 20g de areia da praia com 10g do óleo motor queimado e transferida para Erlenmeyers de 250mL de capacidade, os quais foram submetidos aos seguintes tratamentos:

A - adição de 150 mL de água destilada (controle),

B - adição de 150 mL do líquido metabólico livre de células

C - adição de 150 mL da solução aquosa do biossurfactante isolado com concentração de 1/10, 1/100 1/1000 mL/L.

Os frascos foram submetidos à agitação de 155 rpm por 48h, a 28°C, e em seguida, com o auxílio de uma pinça remover o óleo na porção superior do frasco e retirar apenas a água de lavagem sem derramar a areia. Colocar a areia para secar numa placa previamente pesada e levar a estufa a 100°C por 24 horas após seco fazer os cálculos pela seguintes equações (Tiquia, et al., 1996)

$$\text{Placa vazia} - \text{Placa com solo} = Z \quad (\text{Eq. 1})$$

$$Z - 20g(\text{quantidade do solo inicial}) = Wg(\text{óleo}) \quad (\text{Eq. 2})$$

$$Wg(\text{óleo}) - 10g(\text{volume inicial do óleo}) = g \text{ da remoção do óleo} \quad (\text{Eq.3})$$

RESULTADOS

Produção do biossurfactante

Uma variedade de resíduos, incluindo derivados de óleo vegetal, resíduos de amido, de destilaria de óleos e substâncias lácteas tem sido utilizada na produção de biossurfactante, para redução de custos e impactos causados ao meio devido aos lançamentos em córregos e solos. Nesse trabalho a bactéria *S. marcescens* UCP 1549 foi cultivada em frascos de Erlenmeyers de 500mL de capacidade contendo 100mL do meio alternativo com 6% de manipueira, 5% de óleo vegetal pós-fritura e 4% de parafina como substratos por 48 horas à 28°C e 155rpm. A Figura 1, mostra a produção do biossurfactante durante o crescimento da *S. marcescens* UCP 1549 no meio acima citado em intervalos de tempo de 4 horas por 72 horas, os resultados indicam que o crescimento e a formação do biossurfactante aumentam com o tempo, simultaneamente observa-se a redução da tensão superficial, que ocorre a partir da fase exponencial de crescimento, obtendo valores mínimos após 48 horas e a menor tensão superficial observada na fase estacionária com o valor de 33,10mN/m.

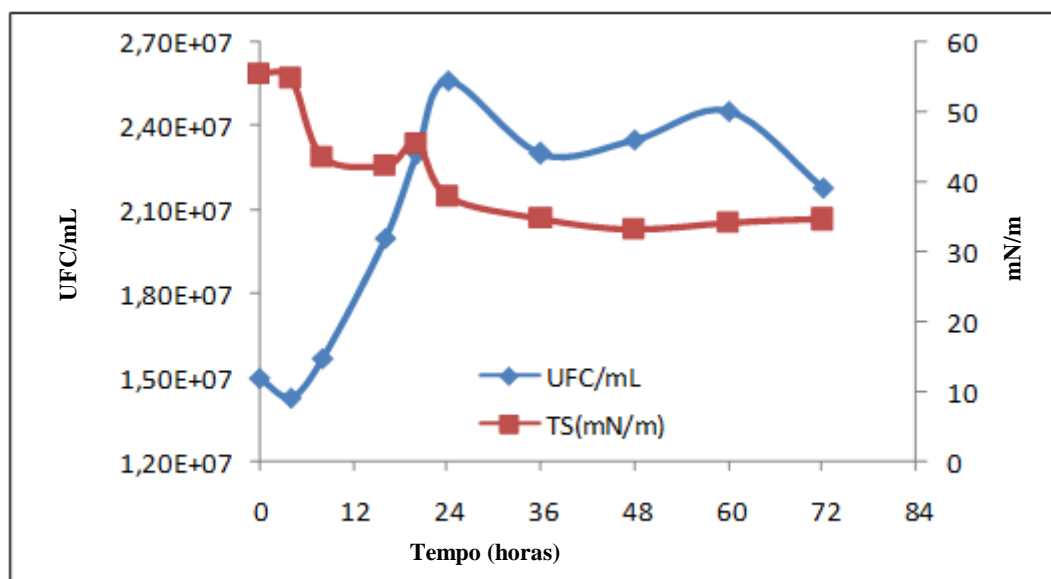


Figura 1: Perfil de crescimento e de redução da tensão superficial durante o crescimento de *Serratia marcescens* UCP 1549 em meio contendo manipueira 6%, óleo vegetal pós-fritura 5% e parafina 4%, por 48 horas à 28°C e 155rpm.

Araújo e colaboradores, 2009 utilizando a *S. marcescens* UCP 1549, e meio de cultura de resíduo de milhocina obteve uma redução da tensão superficial de 25, 82 mN/m. Cunha et al (2004) obtiveram uma redução inicial do meio de 67,8 mN/m para 34,4 mN/m, após 96 horas de cultivo utilizando gasolina como substrato na produção do biossurfactante com *Serratia* sp SVGG16. Ferraz et al 2002, mostrou a habilidade do biossurfactante produzido por *S. marcescens* reduzir a tensão da água de 72 mN/m para 28 mN/m utilizando a manipueira como substrato.

Aplicação do biossurfactante na remoção do óleo

Os hidrocarbonetos derivados de petróleo adsorvem as partículas do solo sendo de difícil remoção e/ou degradação. Os biossurfactantes são capazes de emulsificar os hidrocarbonetos, aumentando a solubilidade em água e reduzindo a tensão superficial, o que facilita o desprendimento dos óleos das partículas do solo (Banat et al., 2000). A Tabela 1 apresenta a remoção do óleo motor misturado com a areia da praia utilizando o líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante que foi capaz de remover 83% do óleo queimado contido na areia, enquanto que a água destilada (controle) removeu 74%.

Tabela 1: Remoção de óleo de motor adsorvido em areia de praia pelo biossurfactante produzido por *Serratia marcescens* UCP 1549 no meio de manipueira (6%), óleo vegetal pós fritura (5%) e parafina (4%) por 48 horas.

Tratamentos	Óleo removido (%)	Óleo remanescente (%)
Água destilada	74	26
Líquido metabólico contendo o biossurfactante	83	17

Nas mesmas condições um biossurfactante produzido por *Rhodococcus* e n-hexadecano removeu 86% do óleo (Abu-Ruwaida, 1991). O biossurfactante isolado de *P. aeruginosa* foi capaz de remover 56% do óleo adsorvido em areia contida em coluna (Cameotra e Makkar, 2004), enquanto que os biossurfactantes produzidos por *Bacillus* cultivados em resíduos de melaço e soro de queijo, em condições termófilas removeram cerca de 30% do óleo contido em coluna (Joshi et al., 2007). O biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* apresentou remoção de 62,2% (Andrade et al., 2009) enquanto que a solução do biossurfactante a 2,5% isolado de *C. glabrata* UCP1002, removeu cerca de 84% do óleo motor adsorvido na areia (Luna et al., 2009).

CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho demonstrou o potencial da bactéria *S. marcescens* UCP 1549 em metabolizar os rejeitos industriais (manipueira, parafina e óleo vegetal pós-fritura) como fonte de carbono e nitrogênio para seu crescimento gerando assim, insumos com alto valor biotecnológico. A conversão de resíduos para insumos representam um novo fluxo de produtos para o âmbito industrial, com o diferencial de serem produtos descartados em certas atividades e transformados em matéria-prima, incentivando estudos futuros para aplicação destes agentes nos processos de descontaminação ambiental uma vez que esses efluentes são lançados ao meio ambiente sem tratamentos prévios. A habilidade na remoção da areia adsorvida com óleo de motor indica o potencial do biossurfactante para aplicações industriais e ambientais, principalmente na recuperação de petróleo, limpeza de reservatórios e na biorremediação de solos contaminados com poluentes hidrofóbicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABU-RUWAIDA, A.S.; BANAT, I.M.; HADITIRTO, S.; SALEM, A.; KADRI, M. Isolation of biosurfactant-producing bacteria-Product characterization, and evolution. *Acta Biotechnologica*, Berlin 2: 315-324.1991.
2. ANDRADE, R.F.S., LUNA, J.M., RUFINO, R.D., COSTA ALBUQUERQUE, C.D., SARUBBO, L.A., CAMPOS TAKAKI, G.M. Surface active agent produced by *Candida lipolytica* using cassava flour wastewater as substrate, In *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2nd, Sevilla-Spain, 751-756.2009.
3. ARAÚJO, H.W.C., CEBALLOS, B.S.O., CAMPOS-TAKAKI, G.M. Biosurfactant production by *Chromobacterium prodigiosum* (*Serratia marcescens*), In *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2nd, Sevilla-Spain pp.676-680.2009.
4. BANAT, I.M., MAKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 53: 495-508.2000.
5. BARANA, A. C. Estudo de carga de manipueira em fase metanogênica em reator anaeróbio de fluxo ascendente e leito fixo. *Dissertação (Mestrado em Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônomicas*. Universidade Estadual Paulista. 2000.
6. BARROS, F.F. C. Estudos das variáveis de processo e ampliação de escala na produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* em manipueira. *Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) - Faculdade de Engenharia de alimentos*. 2007.
7. CAMEOTRA, S.S.; MAKAR, R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* 7:262–266. 2004.
8. CUNHA, C. D. ROSÁRIO M.D., LEITE, S.G.F., ROSADO, A.S. *Serratia* sp SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth ethanol-blended gasoline. *Proc. Biochem.* v.39, 2277-2282, 2004.
9. CASTIGLIONI, G.L., BERTOLIN, T. E., COSTA, J.A.V. Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. *Quim. Nova*, Vol. 32,(2), 292-295, 2009.
10. Ferraz, C., Araújo, A.A., Pastore, G.M.. The Influence of Vegetable Oils on Biosurfactant Production by *Serratia marcescens*. *Appl Biochem and Biotechnol.* 98 (100), 841-847. 2002.
11. JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; JHA, S.; YADAV, S.; NERURKAR, A. DESAI, A.J. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic. *Biores. Technol.* IN PRESS. 2007.
12. KIM, H.S.; J.J.W.; KIM, B.H. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology*, 70: 391-396. 2006.
13. LIMA, A. S. e ALEGRE, R. M. Evaluation of Emulsifier Stability of Biosurfactant Produced by *Saccharomyces lipolytica* CCT-0913. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52 (2): 285-290.2009.
14. LIMA, R. A. et al. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* em caldo de abacaxi (*Ananas comosus*) com óleo de girassol pós-fritura e aplicação na remoção de derivado do petróleo. *Exacta*, 8 (2), 201-210, 2010.
15. LUNA J. M.; SARUBBO L.; TAKAKI, G. M. C. A New Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP 1002: Characteristics of Stability and Application in Oil Recovery. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52(4) :785-793.2009.
16. MATSUURA, A. B. J. Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação. Tese: Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2004.

17. MORETTO, E.; ALVES, R.A. Óleos e gorduras vegetais: processamento e análises. Ed. Da UFSC, Florianópolis – SC, 179 p., 1998.
18. NITSCHKE, M ; FERRAZ, C., PASTORE, G.M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial waster. *Brasilian Journal of Microbiology*.35: 81-85.2004.
19. PIRÔLLO, M. P. S. *Estudo da produção de biossurfactante utilizando hidrocarbonetos. Rio Claro. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)*. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. 2006.
20. RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U.; SANTOS, R. L. C.; SOBRAL, L.G. S. Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores. *Série Tecnologia Ambiental*, STA – 37. Centro de Tecnologia Ambiental, CETEM, 61 p., 2006.
21. SILVA, T.A.L.; ARAÚJO, H.W.C.; TAMBOURGI, E. B.; SILVA, C. A. A.; TAKAKI, G.M. C. Potencial biotecnológico de uma nova linhagem de *Pseudomonas fluorescens* na produção de biossurfactante utilizando petróleo como substrato. *Exacta*, São Paulo. 7(1): 31-37.2009.
22. SOBRINHO, H. B.S., RUFINO, R. D., LUNA, J. M., SALGUEIRO, A. A., CAMPOS-TAKAKI, G. M., LEITE, L. F.C. SARUBBO, L. A.Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. *Process Biochemistry*, 43(9): 912-917. 2008.
23. TIQUIA, S.M.; TAM, N.F.Y.; HODGKISS, I.J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environmental Pollution*, 93:249-256.1996.
24. URUM, K., PEKDEMIR, T.. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosph*.57 (9),1139-1150. 2004.