



Potencial de produção de biossurfactantes por bactérias do gênero rhizobium utilizando óleo de cozinha como fonte de carbono

Fábio Raphael Moreira Cáuper¹, Luciana Lima de Brito Cáuper², Nadionara Costa Menezes³, Estevão Felix da Silva⁴

Submetido 27/08/2016 – Aceito 14/11/2016 – Publicado on-line 14/11/2016

RESUMO

Os biossurfactantes ou substâncias tensoativas dividem preferencialmente a interfase entre fluídos com diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio tais como óleo/água ou ar/água interfacial. Estes podem ser utilizados em várias atividades industriais que envolvam o uso de surfactantes sintetizados quimicamente. Além da capacidade de fixar nitrogênio, é de interesse que essas bactérias possuam outras características importantes para o desenvolvimento vegetal. Isso porque, além da fixação biológica de nitrogênio, as diazotróficas podem contribuir para o crescimento vegetal de outras culturas leguminosas ou não leguminosas, essas bactérias que contribuem para o crescimento vegetal são conhecidas como rizobactérias. Este trabalho teve como objetivo verificar a capacidade de isolados de rizóbios em produzir biossurfactantes utilizando óleo de cozinha como fonte de carbono. Foi realizada coleta de nódulos no Ramal do caldeirão Km 03, na Br 174 e levados para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Paulista (UNIP), Campus Manaus – AM, para a realização de testes com 15 isolados de rizóbio. Nos testes pode-se verificar que os rizóbios testados são capazes de produzir biossurfactantes tornando a molécula de óleo mais biodisponível.

Palavras chave: Biodegradação, Ecologia, Óleo de cozinha

Potential for the production of biosurfactants by bacteria of the genus rhizobium using cooking oil as carbon source. The biosurfactants or surface-active substances preferably divide the interface between fluids with different degrees of polarity and hydrogen bonding such as oil / water or air / water interfacial. These may be used in various industrial activities involving the use of surfactants chemically synthesized. Besides the ability to fix nitrogen, it is interesting that these bacteria have other important characteristics for plant development. That's because, in addition to biological nitrogen fixation, the diazotrophic can contribute the plant growth of other legumes or non-leguminous crops. The bacteria which contribute to plant growth are known as rhizobacteria. This work aimed to verify the rhizobia isolates capacity to produce biosurfactants using cooking oil as a carbon source. Nodules collection was carried out in cauldron extension, Km 03, Br 174 and taken to the Microbiology Laboratory of the University Paulista (UNIP), Campus Manaus - AM, for testing with 15 isolates of Rhizobium. In tests it can be seen that the tested rhizobia are able to produce biosurfactants, making the oil molecule more bioavailable.

Key words: Biodegradation, Ecology, Cooking oil

¹Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), fabio.cauper@gmail.com

²Doutoranda pelo Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), luci_brito@hotmail.com

³Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), naramenezes19@hotmail.com

⁴Bacharel pelo curso de Farmácia da Universidade Paulista (UNIP), estevaovivi@gmail.com

1. Introdução

O termo surfactante tem sua origem na abreviatura da expressão em inglês Surface Active Agents (CRISTOFI; ISHIVA, 2002), que significa literalmente- agente de atividade superficial. É um composto caracterizado pela capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido (BARROS et al., 2008).

Os surfactantes são moléculas anfifílicas ou anfipáticas, visto serem constituídas de duas frações distintas apolar (hidrofóbica) e polar (hidrofílica). E sua eficácia é determinada pela sua capacidade de diminuir a tensão superficial, que é uma medida da energia superficial livre (entalpia da superfície livre) por unidade de área requerida para trazer a molécula para a superfície, ou seja, a força que age na superfície de um líquido promovendo a minimização da área superficial (MESQUITA, 2004). Isso possibilita a utilização de compostos que normalmente são insolúveis em meio aquoso. Em geral, a estrutura dos biossurfactantes inclui uma porção hidrofílica que consiste de aminoácidos, peptídeos, ânions ou cátions, mono, di ou polissacarídeos e uma porção hidrofóbica consistindo de ácidos graxos saturados ou insaturados (SINGH; CAMEOTRA, 2004).

Um das principais classes dos surfactantes naturais são os biossurfactantes, que consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos, levedura, plantas (saponinas), animais (sais biliares) e principalmente em microrganismos. São classificados de acordo com a sua composição química e sua origem, onde a produção dessas moléculas ocorre quando os substratos fornecidos aos microrganismos são hidrocarbonetos. Esta pode se apresentar na forma solúvel em água (açúcar e álcool, por exemplo) ou insolúvel, como os óleos vegetais (ABOUSEOUD et al., 2010). Também podem ser chamados de substâncias tensoativas e dividem preferencialmente a interfase entre fluídos com diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio tais como óleo/água ou ar/água interfacial. Estes podem ser utilizados em várias atividades industriais que envolvam o uso de surfactantes sintetizados quimicamente como a indústria de petróleo, farmacêutica, médica, de cosméticos, na agricultura para a formulação de

herbicidas e pesticidas, na produção de produtos de higiene pessoal, detergentes, processamento de alimentos, tratamento e processamento de metais, vestuário, processamento de polpas de papel, indústria de tinta, emulsões e floculação (ANISZEWSKI et al., 2003).

Pelo fato dos biossurfactantes serem sintetizados a partir de substratos renováveis e grande diversidade química possuem a vantagem de possibilitar aplicações específicas e possuem também características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os torna comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência. Outra vantagem reside no fato de serem compostos que não são derivados de petróleo, fator importante à medida que os preços do petróleo aumentam. Além do fato de serem substitutos dos emulsificantes convencionais em alimentos e cosméticos, originando maior apelo de mercado pelo fato desses produtos serem considerados naturais, além de apropriados para aplicação ambiental e a sua favorável possibilidade de produção através do processo de fermentação. São de grande importância ecológica atuando em áreas contaminadas que representam uma ameaça ambiental, principalmente as grandes áreas industriais. (MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001).

Portanto esse trabalho tem como objetivo testar a capacidade de isolados de rizóbios quanto à produção de biossurfactantes, baseando-se na redução da tensão superficial e aumento da atividade emulsificante, utilizando óleo de cozinha como fonte de carbono.

2. Material e Método

2.1 Seleção de rizóbios

Foram coletados, no Ramal do caldeirão km 3 na Br 174, nódulos da rizosfera de plantas leguminosas para adquirir as bactérias do gênero rizóbio e levados para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Paulista (UNIP), Campus Manaus – AM (Tabela 1). Para a realização dos testes inseridos nesse trabalho, foram utilizados 15 isolados usando a metodologia descrita por Vincent (1970), onde os isolados obtidos foram mantidos em tubos de ensaio inclinado, contendo o meio YMA (Yeast Agar Mannitol). As amostras

foram numeradas de acordo com a coleção de bactérias e foram armazenadas na coleção.

Tabela 1 - Rizóbios selecionados e utilizados nos testes de biodegradabilidade e produção de biossurfactantes

| Rizóbio | Local | Planta |
|----------|--|---|
| UNIP R13 | Ramal do Caldeirão km 3 S 3° 13' 41,9" W 60° 13' 27,8" | <i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo) |
| UNIP R14 | | |
| UNIP R15 | | |
| UNIP R16 | | |
| UNIP R17 | | |
| UNIP R18 | | |
| UNIP R19 | | |
| UNIP R20 | | |
| UNIP R21 | | |
| UNIP R22 | | |
| UNIP R23 | | |
| UNIP R24 | | |
| UNIP R25 | | |
| UNIP R26 | | |
| UNIP R27 | | |

2.2 Morfologia das Bactérias

A caracterização morfológica das bactérias foi realizada observando as seguintes características descritas na tabela 2 conforme Vincent (1979) e Martins (1997).

Tabela 2 - Descrição utilizada para caracterizar morfológicamente as bactérias

| Morfologia das Bactérias | Característica |
|--------------------------|-----------------------------|
| Forma da Colônia | Circular/ Irregular |
| Borda | Regular/ Irregular |
| Transparência | Sim/ Não |
| Aparência da Colônia | Homogênea/ Heterogênea |
| Cor da colônia | Branca/ Amarela |
| Aparência do muco | Homogêneo/ Heterogêneo |
| Elasticidade do muco | Com/ Sem |
| Quantidade de muco | Pouco/ Moderado/ Abundante/ |

2.3 Teste de degradação de óleo de cozinha por isolados de rizóbios, utilizando fontes de carbono distintas

Para avaliar a capacidade de degradação de óleo de cozinha e o crescimento bacteriano, foram testados 15 isolados de rizóbios, através do método de riscagem proposto por Oliveira e Magalhães (1999) modificado, realizado em placas de Petri contendo meio de cultura YMA, onde foi utilizado 0,1 mL de óleo de cozinha como fonte de carbono

ao invés de manitol. O óleo de cozinha utilizado no experimento foi coletado na cantina da Universidade Paulista – UNIP.

Como controle foi utilizado o manitol ao invés do óleo de cozinha. Esse teste foi realizado em quadruplicata. Foram feitas avaliações a cada três dias, no período de 15 dias, no qual as bactérias foram mantidas em laboratório a uma temperatura de 23 – 28 °C.

De acordo com o desenvolvimento das colônias nas quatro zonas da placa (Figura 1), foram dados valores para o crescimento para cada isolado variando de 1 (sem crescimento visível na placa) a 4 (máximo crescimento em todas as zonas), segundo escala em faixa apresentada na Figura 2.

Com base no crescimento em placas de Petri, os isolados serão classificados como pouco, moderado ou elevado de acordo da metodologia descrita por Oliveira e Magalhães (1999). Para os demais testes, foram escolhidos os isolados que apresentaram nota mínima de 3,06.

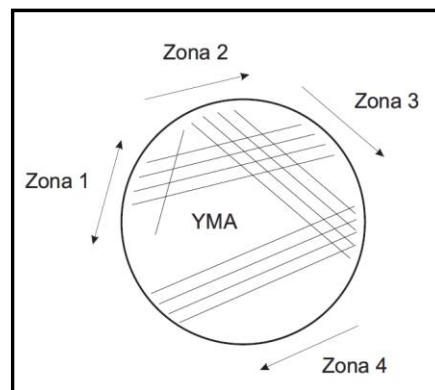


Figura 1 - Ilustração do Método de riscagem para avaliação do crescimento de bactérias de acordo da metodologia descrita por Oliveira e Magalhães (1999)

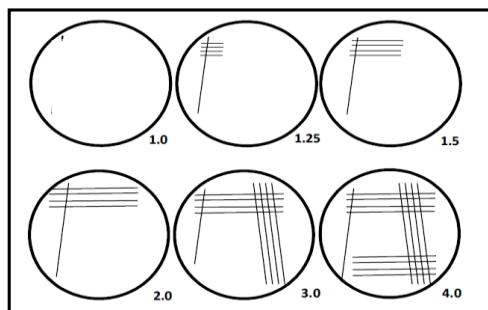


Figura 2 - Valores para crescimento de bactérias de acordo da metodologia descrita por Oliveira e Magalhães (1999)

2.4 Teste qualitativo do colapso da gota de óleo

As bactérias selecionadas no teste foram avaliadas quanto ao potencial de produzir biossurfactantes mediante o teste qualitativo do colapso da gota segundo Bodour e Miller-Maier (1998), que consistiu da adição de 1 µL de suspensão microbiana padronizada a 10^5 UFC.mL⁻¹, dispostas separadamente em placas de multipoços previamente preenchidos com 2,0 mL de meio nutricional YMA líquido e 1 (uma) gota de óleo de cozinha. Após 1 minuto de reação, o resultado foi determinado visualmente. Quando houve o colapso da gota de óleo, formação de microemulsões, o resultado foi considerado positivo, avaliadas pela comparação com os poços em que foi inoculado 1 µL de água destilada estéril utilizada como controle negativo.

2.5 Produção de biossurfactantes

Para a realização desse teste os isolados bacterianos foram cultivados em 50 mL de meio mineral YMA líquido, acrescido de 0,1 mL de óleo de cozinha em tubo falcon. Também foram utilizados como controles, frascos contendo o mesmo meio com o óleo, porém sem bactérias. Os frascos ficaram incubados a 30°C e agitado manualmente diariamente para conferir aeração adequada, por um período de nove dias. O pH inicial e final de cada amostra foram medidos para verificar se houve interferência neste parâmetro químico.

2.6 Avaliação da atividade de emulsificação

Para a realização desse experimento foi utilizada a suspensão de rizóbios do meio mineral SYM (saís do meio YMA – VINCENT, 1970), acrescidos de óleo de cozinha. Para cada 3 mL da suspensão de bactérias, foram adicionados 3 mL de óleo em tubos de ensaio que foram agitados durante 2 minutos em vórtex e deixados por 48 horas em repouso.

Após esse tempo (Figura 3), foram efetuadas medidas da altura da camada de emulsão (CE), água em óleo e da Altura Total (AT) dos líquidos no tubo, expressa em cm. O índice de emulsificação foi obtido através da fórmula: $IE(\%) = (CE/AT) \cdot 100$, descrita por Cooper; Goldenberg (1987). A atividade de emulsificação óleo em água

foi medida pela densidade óptica em espectrofotômetro com medida de 610 nm de absorvância, que foi medida em unidade (JOHNSON et al., 1992).

A qualificação da atividade emulsificante foi feita de acordo com a convenção adotada por Matsuura, 2004 (Tabela 3).

Tabela 3 - Convenção adotada para qualificar a atividade emulsificante

| Atividade emulsificante | Altura da emulsão (tipo água em óleo) | Densidade óptica 610 nm (tipo óleo em água) |
|-------------------------|---------------------------------------|---|
| Alta | ≥ 2 cm | ≥ 1,2 U |
| Moderada | de 1 a 1,9 cm | de 0,7 a 1,1 U |
| Baixa | < 1 cm | de 0,1 a 0,6 U |

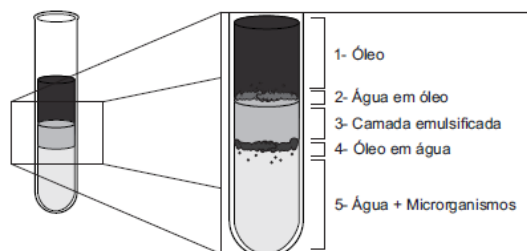


Figura 3 - Desenho esquemático de solução bacteriana com óleo na produção de biossurfactantes.

2.7 Análise estatística

Os ensaios foram realizados com análise de variância (ANOVA), pelo teste F, quando significativo, as comparações de médias foram realizadas pelos testes Tukey, todos os testes realizados ao nível de 5% de probabilidade.

3. Resultados e Discussão

3.1 Morfologia

Na tabela 4 é possível verificar que os 15 isolados de rizóbios apresentaram características distintas em meio YMA, foi possível avaliar a forma da colônia, borda, transparência, aparência da colônia, cor da colônia, aparência do muco, elasticidade do muco e quantidade do muco.

Podemos verificar também que cada isolado tem sua peculiaridade, porém assim como estudos realizados em outros isolados de rizóbios oriundos dos solos de Nova Esperança, noduladores de feijão-fava, todos os isolados não tiveram elasticidade no muco e todas as colônias cresceram na cor branco/leitosa (ANTUNES et al., 2011).



Apenas quatro isolados tiveram forma da colônia circular (UNIP R13, UNIP R24, UNIP R25 E UNIP R26) todo os outros 11 tiveram forma irregular, enquanto que em relação a borda somente dois (UNIP R19 e UNIP R21) se apresentaram irregulares.

Quanto à aparência da colônia somente a UNIP R16, UNIP R17 e UNIP R20 ficou heterogênea, todos os outros se apresentaram de forma homogênea. As seções onde houveram maiores diferenças entre os isolados foram as de transparência e a quantidade de muco, nessas duas avaliações os isolados tiveram diferenças entre si, quatro isolados tiveram pouca quantidade de muco (UNIP R13, UNIP R16, UNIP R21 e UNIP R22), outros seis inoculados apresentaram muco em abundância (UNIP R14, UNIP R18, UNIP R23, UNIP R25, UNIP R26 e UNIP R27), enquanto que cinco tiveram presença de muco moderada (UNIP R15, UNIP R17, UNIP R19, UNIP R20 e UNIP R24).

Quanto à transparência mais da metade não é transparente enquanto que apenas 5 isolados (UNIP R15, UNIP R21, UNIP R22, UNIP R23, UNIP R24) mostraram-se transparente. Essas diferenças de transparência e quantidades de muco entre os isolados também foram notadas em estudos de rizóbios Isolados de Nódulos de Mucuna-Cinza e Mucuna-Anã (LIMA et al., 2012).

3.2 Crescimento

Nas análises das amostras em um período de incubação foi possível observar que o rizóbio UNIP R20 em meio manitol apresentou crescimento até a segunda zona aproximadamente uma hora de incubação destacando-se entre os demais isolados do mesmo dia de repicagem. Entre o 3º e 6º dia, os isolados não apresentaram muita diferença de crescimento entre si, porém de maneira geral a maioria obteve um crescimento de evolução que pode ser considerado pouco ou moderado.

Do 9º ao 15º dia houve uma grande evolução, onde os rizóbios UNIP R13, UNIP R14, UNIP R15, UNIP R16, UNIP R17, UNIP R18, UNIP R19, UNIP R20, UNIP R21 e UNIP R22 apresentaram crescimento elevado isolados com a fonte de carbono, apenas o UNIP R25 teve crescimento moderado e os UNIP R26 e UNIP R27 tiveram pouco crescimento.

No meio com fonte de carbono óleo de cozinha, foram apresentados crescimento elevado nas amostras UNIP R13, UNIP R14, UNIP R15, UNIP R16, UNIP R17, UNIP R18, UNIP R19, UNIP R20, UNIP R21, UNIP R22, UNIP R23, UNIP R24 e UNIP R25, com crescimento moderado apenas do UNIP R27 e pouco crescimento no UNIP R26. Nas amostras UNIP R18, UNIP R20 e UNIP R17 o crescimento foi tão alto que se espalharam e transbordaram em todas as zonas tornando-se uniforme.

Os resultados da média do crescimento são apresentados na tabela 5 deste trabalho, esses resultados foram similares aos estudos de colonização rizosférica e promoção do crescimento por rizóbios em mudas de alface em 2014, cujo crescimento também foi maior a partir da segunda semana (KOZUSNY; ANDREANI, 2014).

3.3 Crescimento em manitol

Quanto ao crescimento em manitol conforme figura 4 abaixo, no 3º dia os 15 isolados apresentaram pouco crescimento, no 6º dia houve uma evolução de 10 isolados para o crescimento moderado, permanecendo apenas 5 isolados com pouco crescimento, no 9º dia 3 isolados tiveram pouco crescimentos e 12 tiveram crescimento elevado, no 12º dia, 2 cresceram pouco, 1 moderado e 12 elevado, no 15º dia de verificação o resultado foi de 12 crescimentos elevados, 2 moderados e 1 pouco.

3.4 Crescimento no óleo de cozinha

Quanto ao crescimento no óleo de cozinha, conforme figura 5, podemos verificar que no 3º dia os 15 isolados apresentaram pouco crescimento, no 6º dia houve uma evolução de 12 isolados para o crescimento moderado permanecendo apenas 3 isolados com pouco crescimento, no 9º dia dos 15 isolados apenas 2 apresentaram pouco crescimento, 3 tiveram crescimento moderado e 10 tiveram crescimento elevado. Já no 12º dia um isolado cresceu pouco, 1 cresceu de maneira moderada e 12 tiveram crescimento elevado. No 15º dia de avaliação 13 isolados apresentaram com crescimento elevado, 1 moderado e 1 cresceu pouco. Então, foram apresentados crescimento elevado nas amostras UNIP R13, UNIP R14, UNIP R15, UNIP R16, UNIP R17, UNIP R18, UNIP

R19, UNIP R20, UNIP R21, UNIP R22, UNIP R23, UNIP R24 e UNIP R25, com crescimento moderado apenas do UNIP R27 e pouco crescimento no UNIP R26. Nas amostras UNIP R18, UNIP R20 e UNIP R17 o crescimento foi tão alto que se espalharam transbordando em todas as zonas se tornando uniforme.

Estudos da comparação morfofisiológica de rizóbios conservados pelas técnicas de liofilização e óleo mineral mostrou crescimento rápido (até 03 dias), com as mesmas características morfofisiológicas na comparação dos métodos (CALIXTO; MERCANTE, 2014).

Tabela 4 - Resultado dos isolados - morfologia

| Isolados | Forma da colônia | Borda | Transp. ⁵ | Apar. ⁶ da colônia | Cor da colônia | Apar. ⁶ do muco | Elast. do muco ⁹ | Quantidade de muco |
|----------|------------------|-----------|----------------------|-------------------------------|----------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------|
| UNIP R13 | circular | regular | não | homog ⁷ | branca | homog ⁷ | sem | pouco |
| UNIP R14 | irregular | regular | não | homog | branca | homog | sem | abundante |
| UNIP R15 | irregular | regular | sim | homog | branca | homog | sem | moderado |
| UNIP R16 | irregular | regular | não | heterog ⁸ | branca | heterog ⁸ | sem | pouco |
| UNIP R17 | irregular | regular | não | heterog | branca | heterog | sem | moderado |
| UNIP R18 | irregular | regular | não | homog | branca | homog | sem | abundante |
| UNIP R19 | irregular | irregular | não | homog | branca | homog | sem | moderado |
| UNIP R20 | irregular | regular | não | heterog | branca | heterog | sem | moderado |
| UNIP R21 | irregular | irregular | sim | homog | branca | homog | sem | pouco |
| UNIP R22 | irregular | regular | sim | homog | branca | homog | sem | pouco |
| UNIP R23 | irregular | regular | sim | homog | branca | homog | sem | abundante |
| UNIP R24 | circular | regular | sim | homog | branca | homog | sem | moderado |
| UNIP R25 | circular | regular | não | homog | branca | homog | sem | abundante |
| UNIP R26 | circular | regular | não | homog | branca | homog | sem | abundante |
| UNIP R27 | irregular | regular | não | homog | branca | homog | sem | abundante |

⁵Transparência da colônia, ⁶Aparência da colônia, ⁷Homogêneo, ⁸Heterogêneo, ⁹Elasticidade

Tabela 5 - Médias de crescimento

| ISOLADOS | 3º dia | | 6º dia | | 9º dia | | 12º dia | | 15º dia | |
|----------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| | Manitol | Óleo | Manitol | Óleo | Manitol | Óleo | Manitol | Óleo | Manitol | Óleo |
| UNIP R13 | 1,25 | 1,18 | 2,06 | 2,25 | 3,56 | 2,50 | 4,00 | 3,43 | 4,00 | 3,50 |
| UNIP R14 | 1,31 | 1,06 | 2,18 | 2,62 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
| UNIP R15 | 1,18 | 1,06 | 2,12 | 2,87 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
| UNIP R16 | 1,37 | 1,43 | 2,31 | 2,68 | 4,00 | 3,50 | 4,00 | 3,80 | 4,00 | 3,90 |
| UNIP R17 | 1,18 | 1,31 | 2,12 | 2,62 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
| UNIP R18 | 1,12 | 1,31 | 2,50 | 2,50 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
| UNIP R19 | 1,06 | 1,00 | 2,50 | 3,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
| UNIP R20 | 2,00 | 1,81 | 2,68 | 2,75 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
| UNIP R21 | 1,25 | 1,06 | 2,00 | 2,43 | 4,00 | 3,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
| UNIP R22 | 1,25 | 1,18 | 2,25 | 2,87 | 4,00 | 3,75 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
| UNIP R23 | 1,18 | 1,25 | 2,12 | 2,56 | 3,68 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
| UNIP R24 | 1,18 | 1,00 | 2,00 | 2,43 | 4,00 | 3,75 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
| UNIP R25 | 1,00 | 1,00 | 1,18 | 1,25 | 1,50 | 1,75 | 1,75 | 3,00 | 2,06 | 3,10 |
| UNIP R26 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,06 | 1,37 | 1,12 | 1,43 | 1,18 | 1,50 |
| UNIP R27 | 1,00 | 1,00 | 1,25 | 1,12 | 1,75 | 2,75 | 2,75 | 2,87 | 2,81 | 3,00 |

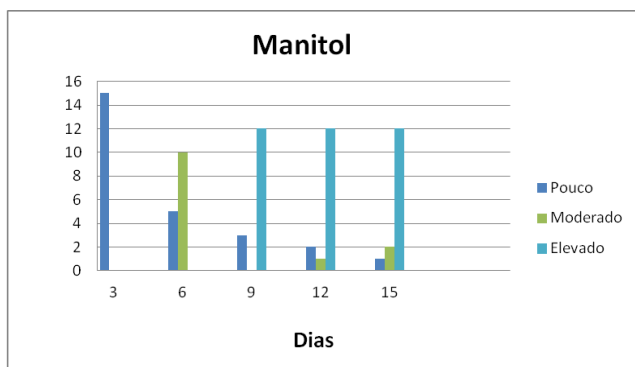


Figura 4 - Crescimento dos isolados em meio YMA

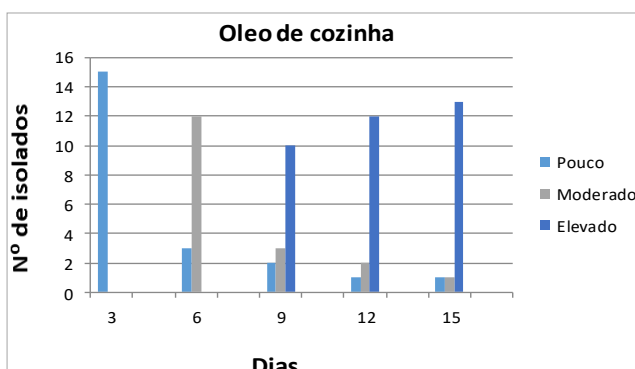


Figura 5 - Crescimento dos isolados em meio YA contendo óleo de cozinha como fonte de carbono

Os resultados dos crescimentos foram parecidos com os de estudos da caracterização e seleção de rizóbios noduladores de leguminosas florestais para recuperação de áreas contaminadas por petróleo, cujos 28 isolados de rizóbio de área contaminada por petróleo foram também cultivados em meio de cultivo levedura-manitol-ágar (YMA), conforme Vincent, o crescimento também se manteve pouco no começo, crescendo gradativamente conforme o passar dos dias (FERREIRA, 2007).

3.5 Colapso da gota de óleo

Os Isolados UNIP R13, UNIP R19, UNIP R26, UNIP R16, UNIP R17 e UNIP R20 apresentaram atividade emulsificante em 1 minuto após a montagem do teste, depois de 24 horas houve uma pequena evolução e após 48 horas os isolados UNIP R13, UNIP R19, UNIP R26 e UNIP R16 apresentaram características de degradação, ou seja, a gota de óleo se dispersou totalmente para as bordas, Os isolados UNIP R17 e R20 não apresentaram total degradação, mas uma degradação considerável.

Estudos realizados com a biodegradação de petróleo e produção de biossurfactante por bactérias indígenas do sedimento do Manguezal de Gargaú no Rio de Janeiro mostrou também que o colapso da gota mostrou-se positivo após 1 minuto de reação, resultado esse determinado visualmente em microscópio estereoscópio, considerando-se positiva a produção de biossurfactante (SILVA et al., 2010).

Os rizóbios UNIP R14, UNIP R15, UNIP R18, UNIP R21, UNIP R22, UNIP R23, UNIP R24, UNIP R25 e UNIP R27 apresentaram uma pequena atividade emulsificante não dispersando o óleo de cozinha para as bordas não havendo colapso da gota, o controle não mostrou nenhuma alteração até às 48 horas.

3.6 Avaliação do pH

Conforme a Tabela 6, quanto a diferença de pH dos isolados no processo inicial e final da pesquisa não houve uma diferença significativa. Não houve, portanto diferença no controle do teste. O UNIP R16 e UNIP R21 se mantiveram inalteráveis, todos os valores se aproximaram ao número 7 ficando entre neutros e alcalinos, a maior diferença entre pH inicial e final ficou no UNIP R18 que saiu de 7,5 para 7.

Tabela 6 - Avaliação do pH dos isolados de rizóbio

| Isolados | pH Inicial | pH Final |
|----------|------------|----------|
| CONTROLE | 7,50 | 7,00 |
| UNIP R13 | 7,10 | 7,00 |
| UNIP R14 | 7,30 | 7,20 |
| UNIP R15 | 7,60 | 7,50 |
| UNIP R16 | 7,60 | 7,61 |
| UNIP R17 | 7,50 | 7,40 |
| UNIP R18 | 7,53 | 7,00 |
| UNIP R19 | 7,70 | 7,60 |
| UNIP R20 | 7,50 | 7,42 |
| UNIP R21 | 7,50 | 7,51 |
| UNIP R22 | 7,60 | 7,33 |
| UNIP R23 | 7,40 | 7,00 |
| UNIP R24 | 7,60 | 7,40 |
| UNIP R25 | 7,70 | 7,44 |
| UNIP R26 | 7,60 | 7,32 |
| UNIP R27 | 7,41 | 7,25 |

Outro trabalho que estudou o potencial biotecnológico de rizóbios como bioemulsificante e biossorvente de cobre e cromo mostrou a mesma insignificância de valores de pH cujos resultados também ficaram inalteráveis ou mudaram pouquíssimo de valor, isto é importante visto que

um bom pH, ou melhor, um pH ideal (pH 7,00) é um dos fatores de ajuda para obtenção de melhor crescimento (MORETTO, 2014).

3.7 Atividade emulsificante

Foi observado que houve diferenças no índice de emulsificação, conforme Tabela 7, sendo observado que o UNIP R19 se destacou entre os demais isolados, e UNIP R17 apresentou um menor índice em relação aos outros isolados.

Tabela 7 - Atividade emulsificante dos isolados de rizóbio em mio YA contendo óleo de cozinha

| Isolados | Média de tratamento |
|----------|---------------------|
| UNIP R13 | 5,32 ab |
| UNIP R14 | 4,27 ab |
| UNIP R15 | 5,01 ab |
| UNIP R16 | 4,65 ab |
| UNIP R17 | 4,03 b |
| UNIP R18 | 5,27 ab |
| UNIP R19 | 5,97 a |
| UNIP R20 | 4,93 ab |
| UNIP R21 | 5,74 ab |
| UNIP R22 | 5,017 ab |
| UNIP R23 | 5,25 ab |
| UNIP R24 | 5,17 ab |
| UNIP R25 | 5,69 ab |
| UNIP R26 | 5,22 ab |
| UNIP R27 | 5,50 ab |

As diferenças notórias e significativas foram apenas dos isolados UNIP R 19 e UNIP R17, os demais isolados UNIP R13, UNIP R14, UNIP R15, UNIP R16, UNIP R18, UNIP R20, UNIP R21, UNIP R22, UNIP R23, UNIP R24, UNIP R25, UNIP R26 e UNIP R27 apresentaram médias parecidas sem diferenças consideráveis, mas de modo geral, conforme mostra tabela 8, a média final foi satisfatória.

Esses resultados também foram similares aos encontrados em um trabalho que verificou a avaliação do potencial de produção de biossurfactantes por isolados de outros 15 rizóbios, cuja pesquisa foi realizada na leitura do índice de emulsificação de água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A). Neste, os valores do índice de emulsificação em água e óleo foram maiores do que o de óleo em água mostrando assim, a intensidade desses rizóbios na produção de biossurfactantes (BRITO et al., 2014).

3.8 Absorbância

Quanto avaliada absorvância da emulsificação foi observado que os isolados UNIP R19, UNIP R21 e UNIP R22 foram os melhores diferenciando-se dos demais. Quanto aos níveis de qualidade seguidos do UNIP R13, UNIP R25, UNIP R26 e UNIP R 27, e os UNIP R14, UNIP R17, UNIP R18, UNIP R20, UNIP R23, UNIP R24 e UNIP R15. O UNIP R16 obteve a nota mais abaixo.

Tabela 8 - Absorbância da atividade emulsificante dos isolados de rizóbio em mio YA contendo óleo de cozinha

| Isolados | Média de tratamento |
|----------|---------------------|
| UNIP R13 | 1,34021 ab |
| UNIP R14 | 1,16336 abc |
| UNIP R15 | 0,78079 bc |
| UNIP R16 | 0,69663 c |
| UNIP R17 | 1,09756 abc |
| UNIP R18 | 1,17447 abc |
| UNIP R19 | 1,58052 a |
| UNIP R20 | 1,09685 abc |
| UNIP R21 | 1,50772 a |
| UNIP R22 | 1,55877 a |
| UNIP R23 | 1,05403 abc |
| UNIP R24 | 1,15639 abc |
| UNIP R25 | 1,31495 ab |
| UNIP R26 | 1,30936 ab |
| UNIP R27 | 1,27174 ab |

4. Conclusão

Em relação à morfologia observou-se que a maioria das amostras dos 15 isolados tiveram as características de colônia circular, borda regular, sem transparência, todos apresentaram cor branca, aparência homogênea, todos sem elasticidade e quantidade de muco moderada.

Em relação ao crescimento foi observado que das amostras em meio manitol, 12 obtiveram uma classificação elevada quando cultivadas com óleo de cozinha dentre os 15 isolados de rizóbios testados. Observou-se então um melhor crescimento no meio com óleo de cozinha como fonte de carbono comprovando sua alta eficiência de degradação em meio sólido.

A avaliação do pH foi considerada nos padrões de normalidade sem alterações significativas, ou seja, dentro dos níveis de normalidade no pH inicial e final.

Em relação ao colapso da gota foram visto que, 4 apresentaram total degradação do óleo, 2 apresentaram uma degradação considerável e os demais com uma degradação

considerada baixa assim favorecendo e demonstrando que a degradação do óleo em meio sólido é maior quando comparada a degradação em meio líquido.

No índice emulsificante somente um isolado se destacou e os demais não apresentaram diferenças significativas, destacando-se 3 isolados, onde 4 obtiveram uma média considerada boa e os outros isolados não apresentaram tanta diferenciação.

De modo geral, os testes mostraram que os rizóbios são excelentes produtores biossurfactantes e também são excelentes degradadores de óleo de cozinha.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

ANTUNES, J. E. L.; GOMES R. L. F.; LOPES, A. C. A.; ARAUJO, A. S. F.; LYRA, M. C. C. P.; FIGUEIREDO, M. V. B. Eficiência simbiótica de isolados de rizóbio noduladores de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **R. Bras. Ci. Solo**, 35:751-757, 2011.

ANISZEWSKI, T.; KUPARI, M. H.; LEINONEN, A. J. Seed number, seed size and seed diversity in Washington lupin (*Lupinus polyphyllus* Lindl.). **Annals of Botany** 87: 77–82.2003.

ABOUSEOUD, M.; YATAGHENE, A.; AMRANE, A.; MAACHI, R. Effect of pH and salinity on the emulsifying capacity and naphthalene solubility of a biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Hazardous Materials**, 180, 15 August 2010, p. 131–136.

BODOUR, A. A.; MAIER, R. M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**. Volume 32, Issue 3, Pages 273-280, 1 May 1998.

BARROS, F. F. C. et al. Surfactina: Propriedades Químicas, Tecnológicas e Funcionais Para Aplicação em Alimentos. **Química Nova**, v30, n2, p409-414,2008.

BRITO, L. L.; MENEZES, N. C.; OLIVEIRA, L. A.. **Avaliação do potencial de produção de biossurfactantes por isolados de rizóbios**, 2014.

CALIXTO, A. C.; MERCANTE, F. M. **Comparação morfofisiológica de rizóbios conservados pelas técnicas de liofilização e óleo mineral**. JIPE 2014.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, 93(6), 915-929, 2002.

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.

FERREIRA T. C. **Caracterização e Seleção de Rizóbios Noduladores de Leguminosas Florestais para Recuperação de Áreas Contaminadas por Petróleo**. Tatiana Corrêa Ferreira. Rio de Janeiro: UFRRJ/ IF, 2007.

JOHNSON, N. C.; PFLEGER, F. L. (1992) Vesicular-arbuscular mycorrhizae and cultural stress. In: G.J. Bethlenfalvay and R.G. Lindennan (eds) *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*, Am. Soc. Agron. Special Publication 54, **American Society of Agronomy**, Madison, pp. 71-99.

KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; ANDREANI, J. R. Estudos da colonização rizosférica e promoção do crescimento por rizóbios em mudas de alface. **Nucleus**, v.11, n.2, out.2014.

LIMA, A. A. J.; PAULO, I. F.; PASSOS, S. R.; PAULO, F. S.; NOSOLINE, S. M., FARIA, S. M.; GUERRA, J. G. M.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; Diversidade e Capacidade Simbiótica de Rizóbios Isolados de Nódulos de *Mucuna-Cinza* e *Mucuna-Anã*(1), **Bras. Ci. Solo**, 36:337-348, 2012.

MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil Biol. Biochem.**, 29(5/6):1005-1010, 1997.

MESQUITA, A. C. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos orgânicos recalcitrantes**. 2004. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MATSUURA, A. B. J.; **Produção e caracterização de biossurfactantes visando**



a aplicação industrial e em processos de biorremediação. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2004.

MORETTO, C. **Potencial biotecnológico de rizóbios como bioemulsificante e bioissorvente de cobre e cromo.** Jaboticabal, 2014 xxii, 117 p.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; Gibbs, B. F. An evaluation of technologies for the heavy metal remediation of dredged sediments. **Journal of Hazardous Materials**. 85, 2001, p. 145-163.

OLIVEIRA, L. A.; MAGALHÃES, H. P. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. **Revista de Microbiologia**. 30:203 – 208, 1999.

SILVA, A. M. F.; MARCIEL, A. B.; MEDEIROS, C. R.; LUGÃO, A. A. M.; WELER-TONINI, R. M. C.; GRATIVOL, A. D.; REZENDE, C. E. Degradação de petróleo e produção de biosurfactante por

bactérias isoladas a partir de sedimentos de um manguezal do estado do Rio de Janeiro. In: **III Congresso Brasileiro de Oceanografia**, Rio Grande (RS), 17 e 21 de maio de 2010.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S.; Trends Biotechnol. 2004, 22, 142. SILVA, Aline Márcia Ferreira Dias, R. M.C. Wetler-Tonini, A. L. R. Wagener, A. D. Gravitól, C. E. Rezende. Biodegradação de petróleo e produção de biosurfactante por bactérias nativas do sedimento do manguezal de gargaú, São Francisco do Itabapoana – RJ. Editora **Essentia**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense, Campos dos Goytacazes/RJ, 2010.

VINCENT, J. M. A manual for practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook N. 15. **Blackwell Scient.** 140p. 1970.

VINCENT, J. M. A manual for the practical study of root-nodules bacteria. **Oxford: Brackwell Scientific Publications**, 1979