



SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA AVALIAR A PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE

R. K. P. Silva¹; S. F. M. Santos¹; A. F. de Almeida²; P. V. S. Dias¹; U. V. da R. Gomes²; Willyan Araújo da Costa¹

¹ Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Engenharia Química

² Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Biotecnologia (DB)

E-mail para contato: r.kellyy@hotmail.com

RESUMO

Devido a vantagens ambientais, há um grande interesse comercial na substituição de surfactantes sintéticos por naturais. Esses são os mais adequados para aplicações como a biorremediação e a dispersão de derramamento de óleo, bem como na recuperação avançada do petróleo. A diversidade de microrganismos capazes de produzir biosurfactantes é vasta e relativamente pouco conhecida. Estima-se que menos de 0,1% e um máximo de 10% das espécies microbianas existentes têm sido descobertas e estudadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes espécies quanto à produção de biosurfactantes. Foram utilizadas cepas *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Debaromyces hansenii* e *Candida guilhermondii*. Os ensaios para avaliação do crescimento microbiano e o potencial de emulsificação óleo de soja foram realizados utilizando o meio sintético, composto por: KH₂PO₄ (3g/L), K₂HPO₄(7g/L), (NH₄)₂SO₄ (1g/L), MgSO₄.7H₂O (0,2g/L), Glicose (10g/L), a 30°C e 200 rpm por 72 horas. O melhor resultado foi obtido com o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* que cresceu até 2 g/L e obteve um índice de emulsificação superior a 70% para o óleo de soja.

1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes ou tensoativos são compostos anfipáticos, por possuírem uma parte polar e outra apolar, caracterizados pela capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um sistema como a interface água/ar. Em sistemas aquosos, as micelas apresentam o interior hidrofóbico e a superfície, em contato com a água, com propriedades hidrofílicas. Estas propriedades tornam os surfactantes adequados para uma ampla aplicação industrial envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação,

capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (Barros et al., 2007).

Tensoativos e emulsionantes são amplamente usados na área industrial, agrícola, alimentos, cosméticos e aplicações farmacêuticas. A maior parte dos compostos é sintetizada quimicamente. Uma forma sustentável consiste na produção de surfactantes a partir de microrganismos, os chamados biosurfactantes, os quais apresentam propriedades semelhantes aos sintéticos (Nitschke et al., 2002). Devido a

suas vantagens ecológicas, há um grande interesse comercial na substituição de surfactantes sintéticos por naturais. Além disso, são os mais adequados para aplicações ambientais como a biorremediação e a dispersão de derramamento de óleo.

Os biossurfactantes têm várias vantagens sobre tensoativos químicos incluindo toxicidade mais baixa e maior biodegradabilidade, a eficácia em temperaturas extremas ou valores de pH (Rodrigues et al., 2006). Embora os biossurfactantes apresentem inúmeras vantagens sobre os surfactantes sintéticos, a produção em larga escala é difícil devido aos custos dos substratos e dos processos biotecnológicos envolvidos, o que os tornam menos competitivos (Makkar et al., 2011; Maneerat, 2005). Com isso, métodos alternativos podem ser utilizados, como fazer uso de substratos mais baratos, proveniente da indústria de alimentos ou agrícola, e dar funcionalidade a todo o meio de cultura utilizado para o crescimento microbiano.

A diversidade de microrganismos capazes de degradar poluentes, tais como o petróleo, e produzindo biossurfactantes é vasta e relativamente pouco conhecida. Dependendo do habitat estudado, estima-se que menos de 0,1% e um máximo de 10% das espécies microbianas existentes têm sido descobertos e estudados. No entanto, o

número de espécies identificadas, com os avanços na pesquisa, cresce a cada ano (Van Hamme et al., 2003).

Nesse sentido, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar diferentes microrganismos quanto ao crescimento e produção de biossurfactante utilizando um meio com glicose como fonte de carbono.

2. METODOLOGIA

2.1. Microrganismo

Para selecionar o microrganismo produtor de biossurfactante foram testados cinco diferentes espécies, dentre elas, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Debaromyces hansenii* e *Candida guilhermondii*.

A *Debaromyces hansenii* CCT 2371, e *Candida guilhermondii* CCT 1516 foram obtidas da Coleção de Culturas da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, Campinas/São Paulo. As culturas foram mantidas no meio YMA (Yeast – Malte - Extract) a 4°C composto por Extrato de levedura (3 g/L), Extrato de malte (3 g/L), Bacto Peptona (5 g/L), Dextrose (10 g/L) e Ágar (20 g/L).

O *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), foi obtido da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, o

Bacillus pumilus, foi isolado do solo cultivado de cana de uma usina de açúcar da região por um aluno de doutorado do REUNI e *Pseudomonas aeruginosa*, isolado do solo de um posto de gasolina na cidade de João Pessoa, estado da Paraíba, Brasil, cedido pelo professor Ulrich Vasconcelos do Centro de Biotecnologia/UFPB. As culturas foram mantidas no meio Luria-Bertani (LB) a 4°C composto por Ágar (20 g/L), Peptona (10 g/L), Extrato de levedura (5 g/L) e Cloreto de sódio (10 g/L).

2.3. 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 Santa'Anna (2011). O meio foi constituído por KH_2PO_4 (3 g/L); K_2HPO_4 (7 g/L); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L); Glicose (10 g/L). 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 biosurfactante

A produção de biosurfactantes foi realizada em frasco elermeyer de 500 mL contendo 200 mL do mesmo meio usado para o inóculo como esquematizado na figura 1. O meio foi esterilizado por 15 min, 1 atm e 121°C, após o resfriamento o inóculo foi

adicionado ao meio para o crescimento microbiano e mantido por 72 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 pelo método de peso seco, e turbidimetria. Os ensaios e análises foram realizados em duplicata.

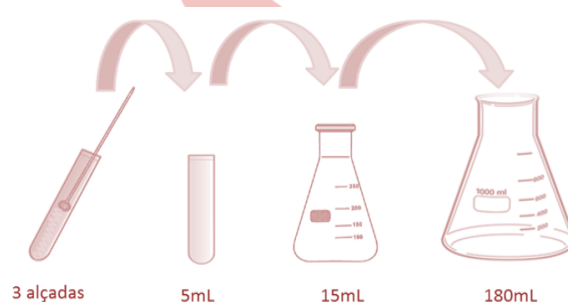


Figura 1 - Esquema ilustrativo do processo de propagação do inóculo

2.4. Análises

Crescimento Microbiano: Utilizou-se o método de turbidimetria, trata-se do monitoramento do crescimento microbiano através da turbidez e lida no espectrofotômetro, à 600nm. Para a determinação da curva de calibração, uma alíquota da suspensão de biomassa foi seca até peso constante, e outra parte da alíquota da mesma suspensão foi diluída para obter a absorbância.

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.

$$IE(\%) = \frac{H_{FE}}{H_{TOTAL}} \times 100(1)$$

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

3. RESULTADOS

Foram testados cinco microrganismos, em iguais condições, verificando o resultado referente ao crescimento do microrganismo e índice de emulsificação. Todos os microrganismos analisados cresceram no meio proposto, como mostrado na figura 2. O que alcançou o maior crescimento foi a *Candida guilliermondii* (CCT 1516), alcançando 4g/L com 48h de cultivo, seguida pela *Pseudomonas aeruginosa*, 2 g/L.

A velocidade específica de crescimento dos microrganismos estudados nesse trabalho estão apresentadas na tabela 1. Banat (1993) produziu biossurfactante utilizando o *Bacillus*

sp. e atingiu a velocidade específica de crescimento de 0,57 h⁻¹, utilizando como fonte de carbono a glicose. Sakthipriya (2015) a partir de *Pseudomonas aeruginosa*, a taxa de crescimento máximo do microrganismo com n-hexadecano e n-eicosano, como substrato foram 0,175 e 0,08 h⁻¹. Os valores da literatura são muito diferentes dos obtidos nesse estudo, isso é devido às diferenças do meio e das condições do cultivo.

Tabela 1–Velocidades específicas de crescimento

Microrganismo	h⁻¹
<i>Bacillus subtilis</i>	0,03 78
<i>Bacillus pumilus</i>	0,01 63
<i>Candida guilliermondii</i>	0,04 76
<i>Debaromyces hansenii</i>	0,02 54
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,03 47

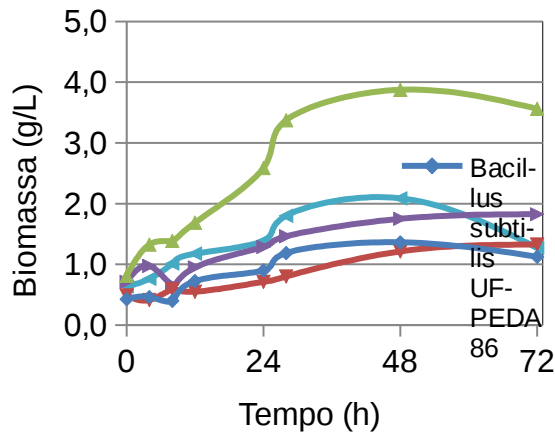


Figura 2 – Crescimento celular para selecionar microrganismos produtores de biossurfactantes.

Em relação ao índice de emulsificação, a *Candida guilhermondii* apresentou um dos piores resultados para o óleo de soja, em contrapartida, a *Pseudomonas* apresentou um índice muito maior quando comparado as demais, alcançado um índice de emulsificação ao final do cultivo, 72 horas de 70%, figura 3.

O *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 foi utilizado por Slivinski (2012) para produzir surfactina e alcançou 52% no índice de emulsificação em 24h utilizando como hidrocarboneto o óleo de soja. Kumar et al. (2015) testou diversas fontes de carbono para

produzir biossurfactante a partir da *Pseudomonas aeruginosa*, atingiu cerca de 50% de índice de emulsificação com o óleo de oliva, petróleo e diesel. A variedade dos biossurfactantes são definidos pelo microrganismos, existem o de alto e de baixo peso molecular. Os biossurfactantes produzidos pela *Debaromyces hansenii* e *Candida guilhermondii*, que são consideradas de alto peso molecular tem a tendência importante de formar emulsões óleo/água, enquanto os que são produzidos pelo *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, são de baixo peso molecular e úteis em reduzir as tensões superficiais e interfaciais, Lima (2007).

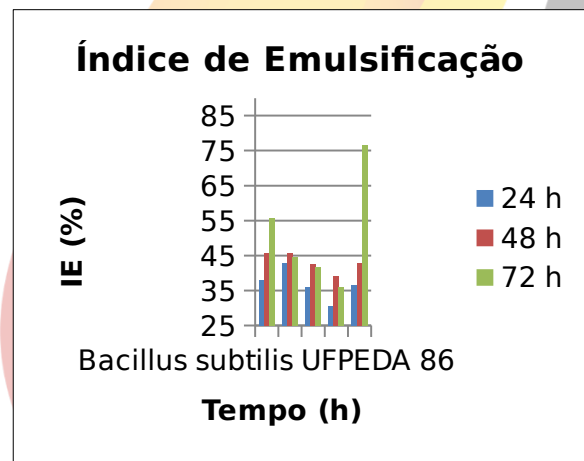


Figura 3 – Índice de emulsificação para a seleção de microrganismo

4. CONCLUSÃO

A importância desse trabalho se dá a partir da comparação de diferentes

microrganismos que são provenientes de diversas fontes (isolados e de culturas nacionais) visando explorar novos microrganismos e reconhecer o seu potencial como produtor de biossurfactante. A nossa capacidade de expansão para entender a diversidade microbiana e o funcionamento de microrganismos vai se traduzir em novos métodos para crescer, purificar e caracterizar biossurfactantes ainda desconhecidos. Para tanto, fora aplicado um meio de cultivo e condições iguais, e mesma fonte de carbono, comparados em relação ao crescimento celular e índice de emulsificação. O microrganismo que obteve o melhor resultado em ambos os critérios foi a *Pseudomonas aeruginosa*, que segue sendo estudado a fim de aperfeiçoar seus resultados.

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.



FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA



6. REFERÊNCIAS

BANAT, I. M. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. *Biote. let.*, v. 15, n. 6, p. 591-594, 1993.

Barros, F. F. C., de Quadros, C. P., Marostica, M. R., & Pastore, G. M., *Surfactina: propriedades química, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos.* *Quim. Nova*, vol. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.

Kumar, A. P., Janardhan, A., Radha, S., Viswanath, B., & Narasimha, G. Statistical approach to optimize production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* 2297.3. *Biotech*, 5(1), p. 71-79, 2015.

LIMA, C. J. B. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual. Tese de Doutorado, 2007.



II CONEPETRO

II CONGRESSO NACIONAL DE ENGENHARIA DE
PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS
IV WORKSHOP DE ENGENHARIA DE PETRÓLEO

Makkaret, R. S., Cameotra, S. S., & Banat, I. M. , Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*, vol. 5, n. 1, p. 1-19, 2011.

Maneerat, S, Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. *Songkl.*, vol. 27, p. 675-683, 2005.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M., Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Quim. Nova*, vol. 25, p. 772-776, 2002.

RODRIGUES, L. R .; Teixeira, J. A .; OLIVEIRA, Rosário. Low-cost meio fermentativo para produção de biosurfactante por bactérias probióticas. *Bioch. Jo. Eng.*, v. 32, n. 3, p. 135-142, 2006.

SAKTHIPRIYA, N.; DOBLE, Mukesh; SANGWAI, Jitendra S. Biosurfactant from *Pseudomonas* species with waxes as carbon source—Their production, modeling and properties. *Jou. Ind. and Eng. Che.*, v. 31, p. 100-111, 2015.

SANTA ANNA, L. M, G. V. SEBASTIAN, N. PEREIRA, JR., T. L. M. ALVES, E. P. MENEZES, D. M. G. FREIRE. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *Appl. bioch. and biotec.*, v. 91, n. 1-9, p. 459-467, 2001.

SLIVINSKI, C. T. 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. *Proc. Bioc.*, v. 47, n. 12, p. 1848-1855, 2012.

Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P., Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol.Mol. Biol. Rev.* 67, 503 e 549, 2003.

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

www.conepetro.com.br

br

(83) 3322.3222

contato@conepetro.com.br

