

Potencial biotecnológico de uma nova linhagem de *Pseudomonas fluorescens* na produção de biossurfactante utilizando petróleo como substrato

Thayse Alves de Lima Silva

Doutoranda e mestre em Engenharia Química – Unicamp
Departamento de Engenharia de Sistemas Químicos e
Informática DESQ/FEQ – Química – Unicamp.
Campinas – SP [Brasil]
ithalv@yahoo.com.br

Hélvia Walewska Casullo de Araújo

Departamento de Química – UEPB;
Doutorado da Rede Nordeste de Biotecnologia – Unicamp;
Professora do Núcleo de Pesquisas
em Ciências Ambientais – Unicamp.
Campina Grande – PB [Brasil]
hwcasullo@ig.com.br

Elias B. Tambourgi

Departamento de Engenharia de Sistemas Químicos e
Informática DESQ/FEQ – Unicamp.
Campinas – SP [Brasil]
eliastam@feq.unicamp.br

Carlos Alberto Alves da Silva

Doutor – Instituto Técnico de Lisboa;
Professor pesquisador do Núcleo de Pesquisas em Ciências
Ambientais – Unicamp.
Recife – PE [Brasil]
calves@unicamp.br

Galba Maria Campos Takaki

Doutorado da Rede Nordeste de Biotecnologia
Campos – Takaki – Unicamp;
Professora do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais –
Unicap.
Recife – PE [Brasil]
gmctakaki@pq.cnpq.br

Os surfactantes químicos ou biológicos são compostos anfifílicos que apresentam propriedades de redução das tensões superficial e interfacial pela acumulação na interface de fluidos imiscíveis, aumento da solubilidade e da biodegradabilidade de compostos hidrofóbicos. Nesse sentido, o potencial de produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* foi investigado utilizando o meio de cultura Luria Bertani, contendo petróleo como substrato nas concentrações de 4 e 8%, sob agitação orbital de 150 rpm, à temperatura de 37°C, por 60 horas. Os resultados obtidos indicaram que *P. fluorescens* produziu um biossurfactante que reduziu a tensão superficial de 70 para 30,04 mN/m. Esses dados demonstraram também sua habilidade para remover e degradar petróleo, por meio da produção de agente surfactante, sugerindo uma possibilidade futura de aplicação nos processos de contaminantes hidrofóbicos como o petróleo.

Palavras-chave: Biossurfactante. Petróleo.
Pseudomonas fluorescens.



1 Introdução

A poluição ambiental por hidrocarbonetos derivados de petróleo é um problema de importância mundial, pois a cada ano aumenta a quantidade de resíduos oleosos emitidos pelas indústrias. Estima-se que anualmente 600 mil toneladas de petróleo bruto contaminam o ambiente por meio de derramamentos por acidentes durante o transporte, da rebentação de poços de petróleo, de processos de descargas ilegais de efluentes industriais e de limpeza de tanques e lastros de navios no mar. Assim, o petróleo derramado flutua e extensas manchas negras são formadas, denominadas marés negras, altamente destruidoras, podendo ocorrer efeitos imediatos ou a longo prazo. Nesse sentido, quando as marés negras atingem as zonas costeiras, a fauna e flora recebem grande carga de substâncias hidrofóbicas e tóxicas, representando um perigo para a cadeia trófica e alimentar, além de consequências econômicas e sociais (DAMAS et al., 2000; HOLMBERG, 2001).

Com isso, cresce o estímulo aos estudos de isolamento, aplicação de micro-organismos e inovação tecnológica no tratamento desses resíduos, para impedir a alteração da qualidade de vida e saúde da população que está intrinsecamente ligada à qualidade ambiental (VANCE-HARROP et al., 2003; URUM et al., 2004).

A pesquisa na área dos biossurfactantes vem crescendo cada vez mais nos últimos anos, em decorrência de seu alto potencial e uso nas diferentes áreas, tais como indústria alimentícia, farmacêutica e petroquímica (SOUMEN et al., 2006; PATTANATU et al., 2008).

Os biossurfactantes são utilizados nos processos de biorremediação, por apresentarem capacidade para degradar substratos insolúveis em água como hidrocarbonetos sólidos e líquidos, gorduras, óleos e graxas, auxiliando, assim, o processo de despoluição; contudo, podem também produ-

zir substâncias com propriedades emulsificantes (MULLIGAN, 2005; PATTANATHU et al., 2008).

O gênero *Pseudomonas*, particularmente *Pseudomonas fluorescens*, está envolvido com a conservação ambiental, em razão de sua habilidade de degradação de compostos xenobióticos, como hidrocarbonetos do petróleo, principalmente n-alcenos, hexadecano, hexano, decano, querosene, hidrocarbonetos aromáticos como o naftaleno e fenantreno, óleos vegetais e óleo cru (RIDGWAY et al., 1990; LATOUR, LEMANCEAU, 1997; SCHMID et al., 1998; HUY et al., 1999; HOLMBERG, 2001; BARATHI et al. 2001; ABOUSEOUD et al., 2008).

Além disso, esse micro-organismo apresenta habilidade para usar substratos hidrofílicos, tais como glicerol manitol, frutose, glicose e óleos vegetais, para produzir biossurfactantes do tipo raminolipídeos (KOCH et al., 1991; DESAI et al., 1997). Vários estudos vêm sendo realizados para definir a melhor relação entre carbono, nitrogênio, fósforo e ferro, necessários para obter uma alta produção dos biossurfactantes (ABOUSEOUD et al., 2008).

Por apresentarem tais propriedades, os surfactantes alteram o comportamento interfacial e o modo como outras moléculas se comportam nas interfaces e na solução, possibilitando a redução na tensão superficial e interfacial, além da formação de microemulsões em que os hidrocarbonetos possam solubilizar-se em água, ou vice-versa (RON et al., 2001; VAN HAMME et al., 2006).

Portanto, essas características conferem excelentes propriedades aos surfactantes, como detergência, emulsificação e ação dispersante, tornando-os produtos químicos versáteis (GALLERT et al., 2002). Neste trabalho, investigou-se a produção de agente surfactante por *P. fluorescens*, utilizando petróleo como substrato, para produção alternativa de biopolímeros com propriedades de redução da poluição ambiental.

2 Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Micro-organismo: a bactéria *Pseudomonas fluorescens* foi isolada de sedimentos de mangue do Rio Formoso (PE) e pertence à Coleção de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco, recentemente cadastrada na Federation Culture Collection-FCC, sob o número UCP 1514. A cultura foi mantida no meio Luria Bertani (LB), à temperatura de 5°C.

Substratos: os substratos utilizados foram dois tipos de petróleos A e B, provenientes da plataforma da cidade do Recôncavo Baiano-Salvador (BA) e de Mossoró, poço na cidade de Mossoró (RN), ambos campos maduros.

Meio de cultura: para crescimento, utilizouse o meio ágar nutriente- AN [(g.L⁻¹) peptona 10,0 g, extrato de carne 3,0 g, NaCl 5,0 g, água destilada q.s.p 1000 ml, pH 7,0], e para o processo fermentativo de *Pseudomonas*, o meio líquido Luria Bertani -LB [Triptona – 10 g, extrato de levedura – 5 g, Cloreto de sódio – 5 g, Glicose – 5 g, água destilada – 1000 mL, pH 6,5-7,0].

2.2 Métodos

Condições de cultivo e produção de biossurfactante

Preparação do inóculo: *P. fluorescens* foi mantida no meio LB, sob agitação orbital de 150 rpm, a 37°C, por 16 horas, para obtenção do pré-inóculo correspondente a 10⁷ UFC/mL. As fermentações foram realizadas em frascos de Erlenmyer de 250 mL de capacidade, contendo 50 mL do meio LB adicionado de 4 e 8% das amostras de petróleo, inoculados com uma suspensão de 10⁷ UFC/mL, mantidos sob agitação orbital de 150 rpm, a 37°C, por 60 horas de incubação. O crescimento foi monitorado pelo número de colônias formadas pela técnica de *pour*

plate. O líquido metabólico livre de células foi obtido por centrifugação de 10.000 g, por 15 minutos, a 6°C, seguido de filtração em filtro Millipore de 0,22µm, sendo submetido à determinação do pH, índice de emulsificação e à tensão superficial.

Crescimento celular: o crescimento celular foi avaliado por meio da técnica de *pour plate*, inoculando alíquotas de 0,1 mL de cada condição, colocadas em placas de Petri, contendo meio ágar nutriente-AN, por 24, 48 e 72 horas. As placas foram incubadas em estufa a 37°C, durante 24 horas, e, em seguida, contadas as colônias viáveis. Os resultados do crescimento foram expressos em UFC/mL.

Métodos analíticos

- Determinação do pH: o comportamento do pH das fermentações foi determinado por potenciometria das alíquotas durante 24, 48 e 60 horas de incubação.
- Atividade de emulsificação: os líquidos metabólicos obtidos das fermentações com 24, 48 e 60 horas, livres de células, foram utilizados para estimar a atividade de emulsificação durante a produção do biossurfactante, utilizando o método descrito por Cooper & Paddock (1984), por meio da densidade óptica a 540nm.
- Determinação da tensão superficial: a determinação da tensão superficial foi realizada em tensiômetro automático (modelo Sigma 70 KSV Ltd., Finland), utilizando-se um anel de platina – iridium. As análises foram realizadas a 25°C, e o aparelho, previamente calibrado conforme o método descrito por Du Nöuy (COOPER et al., 1979). Avaliaram-se as alíquotas coletadas nos períodos de 24, 48 e 60 horas, nas concentrações de 4 e 8% dos substratos utilizados.



3 Resultados e discussão

Efeitos dos substratos (petróleo A e B) como fontes carbono no crescimento de *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas fluorescens foi cultivada no meio LB, contendo 4 e 8% do petróleo A e do B como substratos, durante 24 e 60 horas de incubação. De acordo com os resultados obtidos, observando-se um pH que variou de 7 a 8,2 e uma produção máxima de biomassa com 24 horas de crescimento em todas as condições estudadas, exceto para o controle (tendo glicose como substrato) e petróleo B na concentração de 4%, verificou-se que esse processo ocorreu em 48 horas de incubação, seguida da fase de declínio. Apenas com o petróleo A na concentração de 8% como substrato, observou-se o fenômeno de diauxia com 48 horas de crescimento (Figuras 1 e 2).

Portanto, sugere-se que *P. fluorescens* foi capaz de usar como nutriente os substratos hidrofílico (glicose) e hidrofóbicos (petróleo A e B), confirmando sua habilidade de utilizar vários substratos, encontrando, provavelmente, uma relação ideal de C:N, quando ocorre aumento do pH, demonstrando, assim, o consumo da fonte de nitrogênio existente (peptona e extrato de carne), na promoção do crescimento (KOCH et al., 1991; DESAI et al., 1997; SOUMEN et al., 2006; ABOUSEOUD et al., 2007, 2008).

Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* utilizando petróleo como substrato

No mesmo intervalo de tempo, verificou-se a produção de biossurfactante por *P. fluorescens*, utilizando petróleo como substrato, e observou-se que ocorreu uma redução na tensão superficial e valores significativos na atividade de emulsificação, indicando excelentes

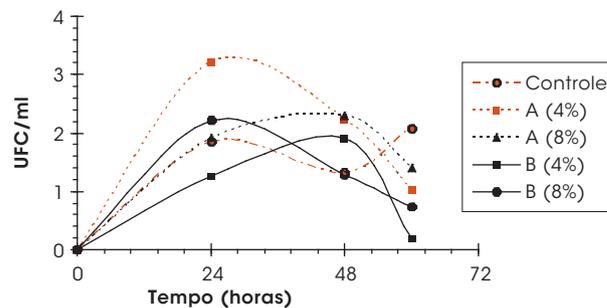


Figura 1: Curva de crescimento de *P. fluorescens* nas concentrações de 4 e 8% dos substratos, petróleo A e B, durante as 60 horas de incubação

Fonte: Os autores.

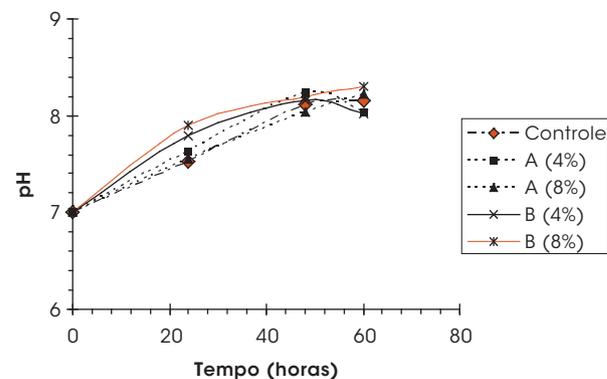


Figura 2: Efeito do pH durante a produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* nas concentrações de 4 e 8% dos substratos; petróleo A e B, durante as 60 horas de incubação

Fonte: Os autores.

propriedades superficiais do biossurfactante, sendo o melhor resultado na concentração de 4% do petróleo B, em que a tensão foi reduzida de 70mN/m, para 30,04 mN/m e a atividade de emulsificação foi de 3,194 U.A.E. (Figuras 3 e 4). A *P. fluorescens* demonstrou também ser capaz de emulsificar esses hidrocarbonetos do petróleo A e B, durante o processo da degradação desses substratos. Esses dados são sugeridos pela literatura, considerando que os micro-organismos que assimilam petróleo ou derivados são comumente encontrados em locais em que ocorre contaminação ou em áreas que, historicamente, tenham sido expostas a

algum tipo de contaminação por hidrocarboneto (BARATHI et al., 2001).

O efeito do pH na atividade superficial tem sido atribuído aos biossurfactantes produzidos por diferentes micro-organismos (ABURUWAIDA et al., 1991).

Resultados similares foram encontrados por Abouseoud e colaboradores (2008), em que *P. fluorescens* apresentou excelente crescimento e produção de biossurfactante em diferentes substratos na fase estacionária. Observaram que o aumento do pH durante a fermentação apresentou-se como um efeito positivo na redução da tensão e na estabilidade da emulsão. Uma importante propriedade dos biossurfactantes potentes é a habilidade de atuarem na redução da tensão

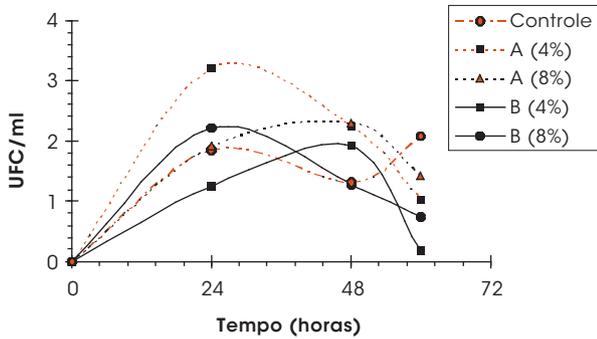


Figura 3: Variação da tensão superficial de biossurfactante produzido por *P. fluorescens* na concentração de 4 e 8% dos substratos; petróleo A
Fonte: Os autores.

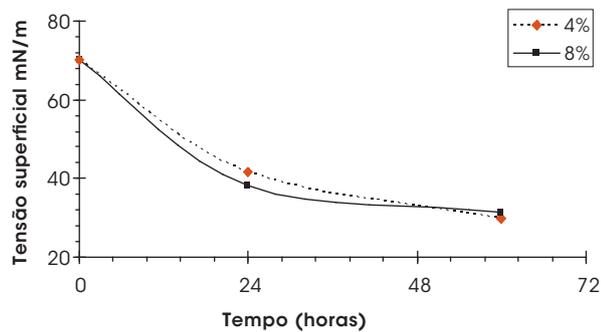


Figura 4: Variação da tensão superficial de biossurfactante por *P. fluorescens* na concentração de 4 e 8% do substrato; petróleo A e B
Fonte: Os autores.

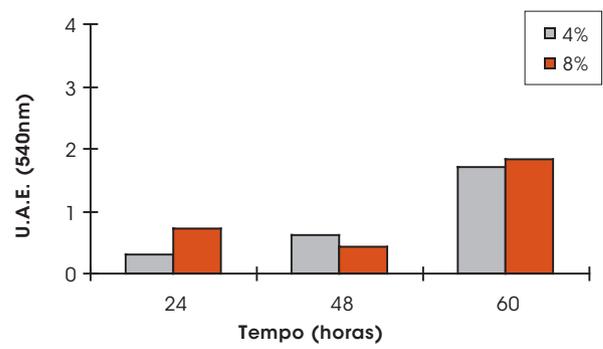


Figura 5: Atividade de emulsificação (AE) de biossurfactante produzido por *P. fluorescens* na concentração de 4 e 8% do substrato; petróleo A
Fonte: Os autores.

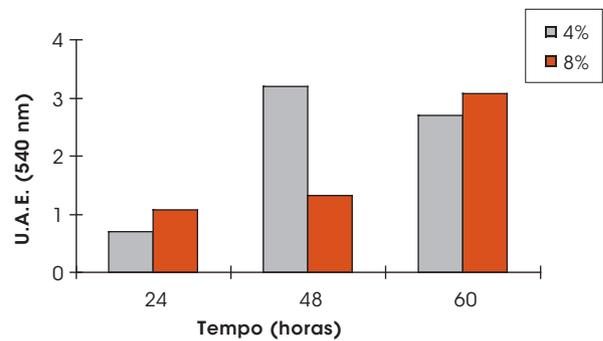


Figura 6: Atividade de emulsificação (AE) de biossurfactante produzido por *P. fluorescens* na concentração de 4 e 8% do substrato; petróleo B
Fonte: Os autores.

superficial de soluções aquosas (NITSCHKE et al., 2004; YOUSSEF et al., 2004).

Haba e colaboradores (2000) realizaram a seleção de 36 micro-organismos para produção de biossurfactante em meio líquido de cultura, contendo 2% de resíduo de óleo de oliva ou de girassol como fonte de carbono, baixando a tensão superficial para 40mN/m. Essa medida foi utilizada como critério de seleção. Após 72 horas de crescimento, muitas espécies de *Pseudomonas* testadas apresentaram crescimento celular e produção de biossurfactante satisfatórios, sendo a tensão superficial de 35mN/m. Os resultados obtidos foram corroborados pelas investigações de Levisaukas e colaboradores (2004), demonstrando que carbo-



no e nitrogênio são nutrientes específicos para estimular a taxa de crescimento celular.

Nesse sentido, sabe-se que o raminolípido apresenta capacidade de baixar a tensão superficial da água de 72 mN/m para 25-30 mN/m, nas concentrações de 10-200 mg/mL. Portanto, é provável que o biossurfactante, secretado por *P. fluorescens* que reduziu a tensão superficial da água de 72 mN/m para 30,4 mN/m (Figuras 5 e 6), indique a presença do raminolípido, considerando a efetiva eficiência de ambos os substratos utilizados (petróleo A e B). Observa-se ainda que um dos fatores mais importantes que podem influenciar a biossíntese de biossurfactante está relacionado com a utilização de substratos insolúveis, como o petróleo, sendo também uma das alternativas estudadas para o aumento da produtividade de biossurfactantes (ALBUQUERQUE et al., 2006; RUFINO et al., 2007; SARUBBO et al., 2007).

4 Conclusões

A nova linhagem de *P. fluorescens* demonstrou grande potencial biotecnológico por utilizar petróleo como fonte de carbono, desenvolvendo e excretando agentes surfactantes eficientes na redução da tensão superficial e com atividades emulsificantes. Assim, sugerem-se novas investigações para aplicação nos processos de descontaminação ambiental.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro concedido pelos órgãos de fomento à pesquisa CNPq, CAPES, FINEP e FACEPE.

Biotechnological potential of the new strain of *Pseudomonas fluorescens* on the biosurfactant production utilizing petroleum as substrate

The chemical or biological surfactants are amphiphilic compounds which can reduce the superficial and interfacial tensions by accumulation on the interface of immiscible fluids, increase of solubility and biodegradability of hydrophobic compounds. Thus, the potential of biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* was investigated utilizing Luria Bertani medium culture, containing petroleum as substrate supplemented with 4 and 8%, maintained in orbital shaking at 150 rpm, and temperature of 37°C, during 60 hours. The experimental results showed that *P. fluorescens* produced a biosurfactant which reduced the surface tension of 70 to 30,04 mN/m. These findings also confirmed its ability to remove and degrade petroleum, by means of production of surfactant agent, suggesting a possibility to apply in processes of hydrophobic contaminants, as petroleum.

Key words: Biosurfactant. Petroleum. *Pseudomonas fluorescens*.

Referências

- ABOUSEOUD, M.; MAACH, R.; AMRANE, A. Biosurfactant production from olive oil by *Pseudomonas fluorescens*. *Trends in Applied Microbiology*, p. 340-347, 2007.
- ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, A. Nabi Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, v. 223, p. 143-151, 2008.
- ALBUQUERQUE, C. D. C.; FILETTI, A. M.; CAMPOSTAKAKI, G. M. Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. *Canadian Journal Microbiology*, v. 52, n. 6, p. 575-583, 2006.
- ABU-RUWAIDA, A. S.; BANAT, I. M.; HADITIRTO, S.; SALEM, A.; KADRI, A. Isolation of biosurfactant - producing bacteria product characterization, and evaluation, *Acta Biotechnology*, v. 11, p. 315-324, 1991.

- BARATHI, S.; VASUDEVAN, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environment International*, n. 26, p. 413-416, 2001.
- COOPER, D. G. PADDOCK, D. A. Production of a Bioemulsifier from *Torulopsis bombicola*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 47, p. 173-176, 1984.
- COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E.; GERSON, F. Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 37, n.1, p. 4-10, 1979.
- DAMAS, A.; ANTUNES, C.; SILVA, N.; ALVES, S. *As marés negras e os seus efeitos tóxicos na fauna marinha*. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, 2000.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, v. 61, p. 47-64, 1997.
- GALLERT, C.; WINTER, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. *Zeitschrift Natuforsch*, v. 89, p. 483-496, 2002.
- HABA E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI 40044 from waste frying oils. *Journal Applied Microbiology*, v. 88, p. 379-387, 2000.
- HOLMBERG, K. Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, n. 6, p. 148-159, 2001.
- HUY, N. Q.; JIN, S.; AMADA, K.; HARUKI, M., HUU, N.; HANG, D. T.; HÁ, D. T. C.; IMANAKA, T.; MORIKAWA, M.; KANAYA, S. Characterization of petroleum-degrading bacteria from oil-contaminated sites in Vietnam. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 88, n. 1, p. 100-102, 1999.
- KOCH, A.; KAPPELL, O.; FIECHTER, A.; REISER, J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Journal of Bacteriology*, v. 173, p. 4212-4219, 1991.
- LATOUR, X.; LEMANCEAU, P. Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Agronomie*, v. 17, p. 9-10, 1997.
- LEVISAUKAS, D.; GALVANAUSKAS, V.; ZUNDA, G.; S. Model-based optimization of biosurfactant production in fed-batch culture *Azotobacter vinelandii*. *Biotechnology Letters*, v. 26, p. 1141-1146, 2004.
- MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, v. 133, p. 183-198, 2005.
- NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.35, p. 81-85, 2004.
- PATTANATHU, K. S. M. R.; EDWARD, G. Production, characterization and applications of biosurfactants – Review. *Asian Network for Scientific Information*, v. 7, n. 2, p. 360-370, 2008.
- RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v. 23, p. 734-741, 2007.
- SARUBBO, L. A.; FARIAS, C. B. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M., Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Current Microbiology*, v. 54, p. 68-73, 2007.
- RIDGWAY, H. F.; SAFARIK, J.; PHIPPS, D.; CLARK, D. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Applied Environmental Microbiology*, n. 56, p. 3565-3575, 1990.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, v. 3, p. 229-236, 2001.
- SCHMID, A.; KOLLMER, A.; WITHOLT, B. Effects of biosurfactant and emulsification on two-liquid phase *Pseudomonas oleovorans* cultures and cell-free emulsions containing n-decane. *Enzyme and Microbial Technology*, n. 22, p. 487-493, 1998.
- SOUMEN, M.; PALASHPRIYA, D.; RAMKRISHNA, S. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnology*, v. 24, p. 509-515, 2006.
- URUM, K.; PEKDEMIR, T.; COPUR, M. Surfactants treatment of crude contaminated soils. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 276, p. 456-464, 2004.
- VANCE-HARROP, M. H.; GUSMÃO, N. B; CAMPOS-TAKAKI, G. M. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using d-glucose and babassu oil as carbon sources. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, p. 120-123, 2003.
- VAN HAMME, J. D.; SINGH, A. W. O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: part I. Physiological aspects. *Biotechnology Advances*, v. 24, p. 604-620, 2006.
- YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; KNAPP, R. M.; MC INERNEY, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. *Journal of Microbiological Methods*, v. 56, p. 339-347, 2004.

Recebido em 13 dez. 2008 / aprovado em 16 jan. 2009

Para referenciar este texto

SILVA, T. A. L. et al. Potencial biotecnológico de uma nova linhagem de *Pseudomonas fluorescens* na produção de biosurfactante utilizando petróleo como substrato. *Exacta*, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 31-37, 2009.

