

## AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE A PARTIR DA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* UTILIZANDO DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO

Renata Kelly Pereira da Silva<sup>1</sup>; Sharline Florentino de Melo Santos<sup>2</sup>; Andréa Farias de Almeida<sup>3</sup> ;  
Willyan Araújo da Costa<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Engenharia Química - [r.kellyy@hotmail.com](mailto:r.kellyy@hotmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Engenharia Química - [sharlinefm@hotmail.com](mailto:sharlinefm@hotmail.com)

<sup>3</sup> Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Biotecnologia (DB) - [andreaform@cbiotec.ufpb.br](mailto:andreaform@cbiotec.ufpb.br)

<sup>4</sup> Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Engenharia Química - [willyam\\_wizard@hotmail.com](mailto:willyam_wizard@hotmail.com)

### RESUMO

Tendo em vista as novas descobertas de reservas de petróleo e a grande demanda desta matéria-prima em escala mundial, é necessária a melhoria dos métodos de recuperação existentes e a criação de novos com o objetivo de aumentar a capacidade produtiva de cada poço de petróleo. Dentre as principais alternativas utilizadas na recuperação do petróleo, o uso de biossurfactante aponta como uma técnica promissora, pois se trata de uma tecnologia de baixo impacto ambiental e, devido às regulamentações mais rigorosas do meio ambiente, influencia na substituição dos seus homólogos químicos. A composição e as características dos biossurfactantes produzidos por microrganismos são influenciadas pela natureza das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas, assim como pela presença de fósforo, ferro, manganês e magnésio no meio de produção. Para obtenção de grande quantidade de biossurfactante é de fundamental importância o estudo dos requerimentos nutricionais e das condições do processo. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes fontes de nitrogênio quanto à produção de biossurfactantes. Foi utilizada cepa de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de solo de posto de gasolina. Os ensaios para avaliação do crescimento microbiano e do potencial de emulsificação com diferentes óleos foram realizados utilizando o meio sintético, composto por: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(7g/L), fonte de nitrogênio (1g/L), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,2g/L), Glicose (10g/L), a 30°C e 200 rpm por 96 horas. O melhor resultado foi obtido com o sulfato de amônio cresceu até 2,8 g/L e reduziu 53,63% a tensão superficial da água.

Palavras-chave: Tensoativos, MEOR, microrganismos, índice de emulsificação.

## 1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes ou tensoativos são caracterizados por uma estrutura anfipática (por possuírem uma parte polar e outra apolar) como ilustrado na figura 1, por propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas a depender da carga do grupo polar (aniônico, catiônico, neutro ou tipos anfotéricos), caracterizada pela capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um sistema como a interface água/ar, água/óleo. Outra propriedade fundamental dos surfactantes é a tendência de formar agregados chamados micelas ou se associar em interfaces, favorecendo a mínima carga de energia livre do sistema [BANAT et al., 2000; SINGH et al., 2007; PACHECO et al., 2010].

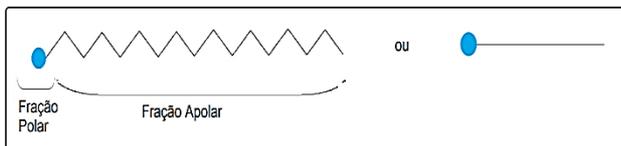


Figura 1 : Molécula de tensoativo.

Elas se acumulam nas interfaces para "mediar" as fases de polaridade diferente, como óleo-água, ar-água, água-sólido e agir como de agentes umectantes em superfícies sólidas. Este processo dinâmico baseia-se na capacidade do tensoativo de reduzir a tensão superficial regulando disposição das moléculas do líquido, influenciando assim a formação de ligações de hidrogênio e

interações hidrofóbicas ou hidrofílicas. O valor mínimo de tensão superficial alcançado, e a concentração micelar crítico (CMC), são os parâmetros utilizados para medir a eficiência do surfactante [SINGH et al., 2007; Fiechter, 1992].

Os tensoativos microbianos ou biosurfactantes são um grupo de moléculas produzidas por diferentes microrganismos e classificados principalmente pela sua estrutura química e origem microbiana, e são constituídos por uma porção hidrófila, que compreende um ácido, péptidos, mono, di ou polissacáridos e uma porção hidrofóbica saturada ou insaturada com cadeias de hidrocarbonetos ou de ácidos graxos [BANAT et al., 2010].

A maioria dos surfactantes é sintetizada a partir do petróleo, o que lhes confere características não biodegradáveis [NITSCHKE et al., 2002; MANEERAT, 2005]. Os surfactantes são adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, molhante, solubilização e dispersão de fases [BARROS et al., 2007].

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 [CHEN et al., 2007].

Eles são utilizados na recuperação avançada de petróleo, na limpeza dos vasos contaminados, facilitar o transporte de petróleo pesado por gasoduto, melhorando a mobilização de hidrocarbonetos e aumentando a recuperação de petróleo bruto [SILVA et al., 2014; ELLEN et al., 2014].

Atualmente a disponibilidade de grandes quantidades de biossurfactantes é comercialmente limitada, pois o custo de produção de biossurfactante em grandes quantidades ainda é elevado [YAHYA et al., 2014]. 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].

O presente trabalho tem como objetivo estudar a produção de biossurfactante utilizando quatro diferentes fontes de nitrogênio, dentre elas, sulfato de amônio, ureia, extrato de levedura e nitrato de sódio.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Microrganismo

A *Pseudomonas aeruginosa* foi 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. A cultura foi mantida no meio Luria-Bertani (LB) modificado 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 20 mL do meio de cultivo, proposto por Santa' Anna [2011]. O meio foi constituído por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3g/L);  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (7g/L); Fonte de nitrogênio (1g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2g/L); Glicose (10g/L). O inóculo foi preparado em elermenyer contendo 20 mL do meio de cultivo em mesa agitadora a 30 °C e 200 rpm por 24h.

### 2.3. Produção de biossurfactante

A produção de biossurfactantes foi realizada em frasco elernmeyer de 500 mL contendo 200 mL do mesmo meio usado. 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 96 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, tensão superficial e crescimento microbiano pelo método de peso



seco e turbidimetria. Os ensaios e análises foram realizados em duplicata.

## 2.4. Análises

**Crescimento microbiano:** Utilizou-se o método de turbidimetria descrito por Veloso [2007]. As amostras foram diluídas de 1:10 com água destilada e as leituras de absorbância feitas no espectrofotômetro, à 600nm. Para a determinação da curva de calibração, no final do cultivo, 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 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, como proposto por Wei et al., 2005. O teste do índice de emulsificação foi realizado em duplicata.

**Tensão superficial:** A tensão superficial do fluido foi medida utilizando o equipamento SensaDyne Tensiometer, do Laboratório de Tensoativos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). O

método foi o da pressão máxima da bolha, em que dois capilares com tamanhos de orifícios diferentes são imersos no fluido por onde é bombeado um gás inerte (nitrogênio) produzindo uma pressão diferencial, este valor é diretamente proporcional à tensão superficial do fluido. A diluição na qual a tensão começa a aumentar é a chamada diluição micelar crítica, sendo um fator pela qual a concentração efetiva de biossurfactante excede a concentração micelar crítica, logo, a DMC, diluição micelar crítica, foi determinado pelo ponto central de inflexão da curva do gráfico dado pela relação entre o valor da tensão superficial e a razão em volume da solução do biossurfactante, não purificado com a água.

## 3. RESULTADOS

Foram testadas quatro fontes diferentes de nitrogênio, em iguais condições, verificando o resultado referente ao crescimento da *Pseudomonas aeruginosa*, tensão superficial e índice de emulsificação. A *Pseudomonas aeruginosa* cresceu bem no meio proposto com as diferentes fontes de nitrogênio, como mostrado na figura 2. As duas fontes que se destacaram foram o sulfato de amônio e a ureia alcançando 2,8 g/L em 48h de cultivo.



## II CONEPETRO

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

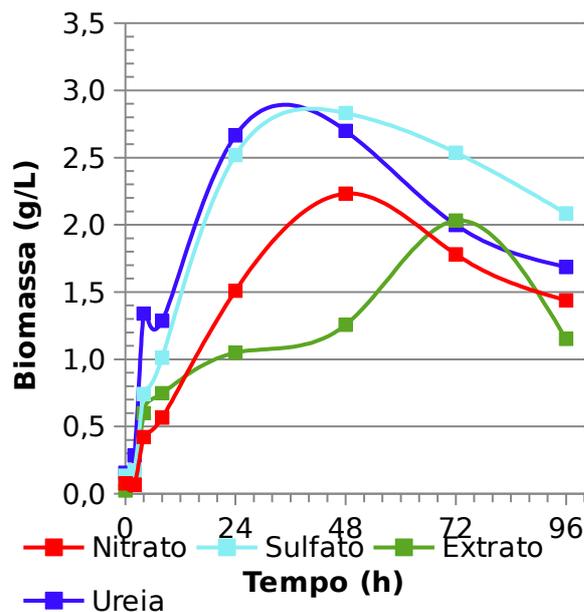


Figura 2 : Crescimento celular com diferentes fontes de nitrogênio.

Uma emulsão é formada quando uma fase líquida é dispersa como gotículas microscópicas em outra fase líquida contínua. Os biotensoativos podem estabilizar (emulsionantes) ou desestabilizar (desemulsionantes) a emulsão. [DESAI E BANAT, 1997]. Segundo Willumsen e Karlson [1997], um critério para ser considerado como bom emulsificante é a capacidade de formar emulsão com o hidrocarboneto e a manter acima de 50 % por 24 horas ou mais.

Com o intuito de comparar melhor os índices de emulsificação, foram testados outros compostos hidrofóbicos como óleo de motor virgem (20 W), querosene comercial e óleo de soja. Os maiores índices foram

alcançados com o óleo de motor usado, aproximadamente 100% para todos. O índice de emulsificação com o óleo de motor virgem foi melhor com o sulfato e com extrato chegando a valores superiores a 90%, os menores índices foi os encontrados utilizando querosene em que o pico se deu com a ureia, 37%. As fontes de nitrogênio que apresentaram os maiores índices foram o sulfato e ureia, respectivamente.

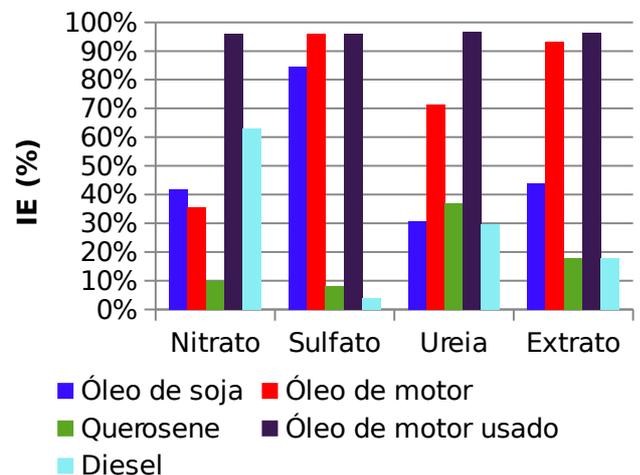


Figura 3 : Índice de emulsificação com 96h de cultivo.

A medida da tensão superficial é uma ferramenta simples e um método indireto para monitorar a produção de biossurfactantes. A medida que o microrganismo cresce, ele sintetiza o biossurfactante e este metabólito é lançado ao caldo, reduzindo a tensão superficial [BEZERRA, 2012].

De acordo com a classificação dos biossurfactantes, existe o de alto e de baixo

[www.conepetro.com.br](http://www.conepetro.com.br)

br

(83) 3322.3222

[contato@conepetro.com.br](mailto:contato@conepetro.com.br)

peso molecular. Os que são produzidos pela *Pseudomonas aeruginosa*, são de baixo peso molecular e úteis em reduzir as tensões superficiais e interfaciais. [LIMA, 2007].

Na tabela 1 são mostradas as tensões superficiais com 96h de cultivo para as diferentes fontes de nitrogênio testadas, o que alcançou o menor valor foi utilizando extrato de levedura (32,9 mN/m) e sulfato de amônio (33,2 mN/m), os maiores valores foram 39,2 mN/m para o nitrato de sódio e 37,0 mN/m para a ureia.

Tabela 1 : Tensão superficial com 96h de cultivo

Fonte de Nitrogênio	T (mN/m)
Nitrato de sódio	39,2
Sulfato de amônia	33,2
Ureia	37,0
Extrato de levedura	32,9

A concentração de biossurfactante pode também ser indicada em termos da diluição micelar crítica, estimada pela medição da tensão superficial em diferentes diluições.

Em concentrações superiores a CMC, o tensoativo excedente tende a formar micelas no interior da solução, as quais não

modificam o valor da tensão superficial significativamente.

Apenas para os menores valores obtidos da tensão superficial que foram feitas as curvas da cmc e vale ressaltar que não foi feita a DMC para o biossurfactante purificado, e interessante industrialmente o custo gerado na purificação, por isso optou-se por fazer a DMC com o biossurfactante impuro.

Nas Figuras 5,6,7 e 8 são mostradas as curvas de tensão superficial versus razão de volume do biossurfactante em relação à água destilada (mL de meio fermentado/mL de água destilada), observa-se que o aumento da concentração do biossurfactante na solução provocou uma diminuição gradativa da tensão superficial até o ponto na qual a DMC foi atingida, na figura 5 com 0,24 mL de biossurfactante/mL de água, a partir desta razão, mesmo com o aumento da concentração de ramnolípídeo, não há redução adicional da tensão superficial.

O cultivo com o Nitrato de sódio, figura 5, apresentou uma ótima capacidade de redução da tensão superficial já que foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 92 para 39,0 mN/m.



**II CONEPETRO**

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

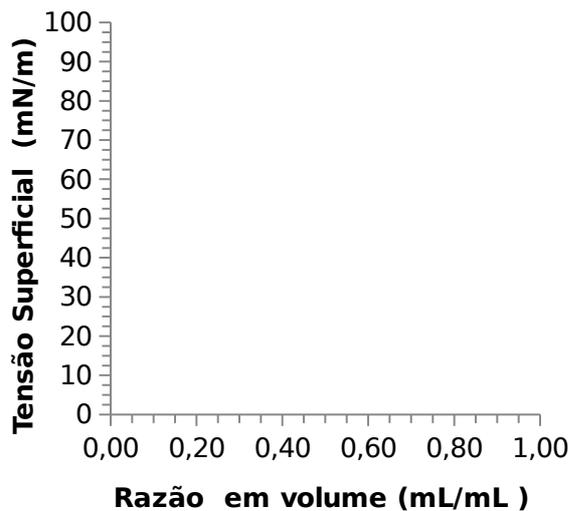


Figura 5 : Diluição micelar crítico para o Nitrato de sódio.

Com o cultivo com sulfato de amônio, figura 6, a tensão superficial da água foi de 71,6 para 33,2 mN/m, 53,63% de redução e o valor da razão foi mais alto, 0,40 mL de meio fermentado /mL de água.

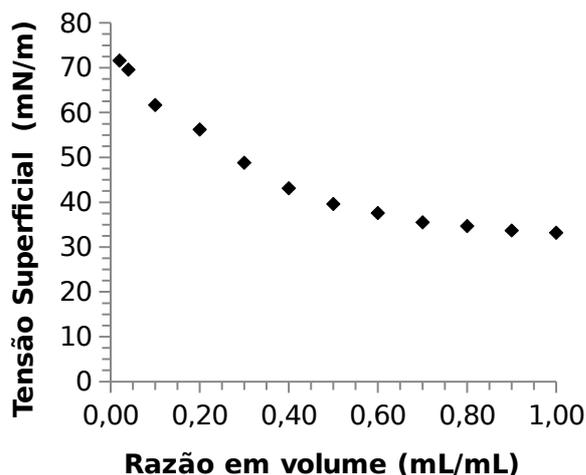


Figura 6 : Diluição micelar crítico para o Sulfato de amônio.

Com a ureia, figura 7, a tensão superficial foi de 73,3 para 37 mN/m reduzindo 49,52%, a razão foi de 0,27 mL/mL.

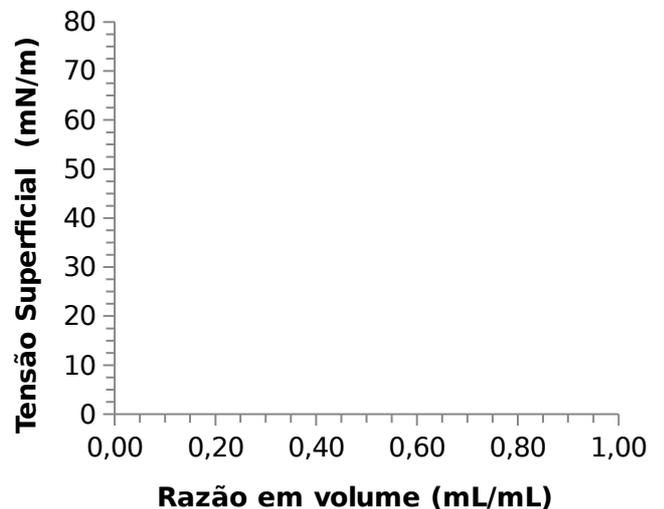


Figura 7 : Diluição micelar crítico para a Ureia.

Utilizando como fonte de nitrogênio, figura 8, o extrato de levedura foi possível reduzir a tensão da água de 82 para 32,9 mN/m sendo uma redução de 63,03%, a razão foi de 0,33 mL/mL para obter uma menor tensão.

[www.conepetro.com.br](http://www.conepetro.com.br)

**br**

(83) 3322.3222

contato@conepetro.com.br



## II CONEPETRO

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

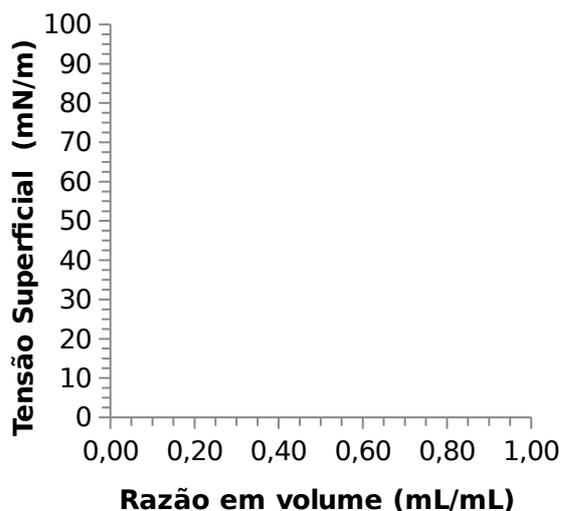


Figura 8 : Diluição micelar crítico para o Extrato de levedura.

Um baixo valor de DMC indica que uma pequena quantidade do biossurfactante é necessária para obter uma elevada eficiência, nesse ponto utilizando como fonte de nitrogênio o nitrato de sódio foi o melhor resultado.

#### 4. CONCLUSÃO

Ao avaliar o cultivo da *Pseudomonas aeruginosa* com quatro diferentes fontes de nitrogênio dentre elas sulfato de amônio, nitrato de sódio, extrato de levedura e uréia, o maior concentração de células foi atingida em 48h com o sulfato e uréia e alcançou 2,8 g/L. A partir do índice de emulsificação os melhores resultados foram com o sulfato de amônio e a menor tensão superficial foi alcançada com o extrato de levedura

(32,9mN/m) seguido do sulfato de amônio (33,2 mN/m) e a maior redução da tensão superficial foi com o extrato de levedura, seguido com o sulfato de amônio. De modo geral, os melhores resultados foram alcançados com o sulfato de amônio.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao Laboratório de Tensoativos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, a Professora Fabiola Dias da Silva Curbelo do Laboratório de Petróleo da Universidade Federal da Paraíba e coordenadora da PRH/ANP-54, a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP –, da Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP – e do Ministério da Ciência e Tecnologia – MCT por meio do Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor Petróleo e Gás – PRH-ANP/MCT.



**FINEP**

FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA



Programa de  
Recursos Humanos  
da ANP



**anp**  
Agência Nacional  
do Petróleo,  
Gás Natural e Biocombustíveis

#### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[www.conepetro.com.br](http://www.conepetro.com.br)

**br**

(83) 3322.3222

[contato@conepetro.com.br](mailto:contato@conepetro.com.br)



**II CONEPETRO**

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

APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; SMITHA, H. **Production and characterization of biosurfactant produced by a novel Pseudomonas sp. 2B.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 95, p. 23-29, 2012.

BANAT, I. M., FRANZETTI, A., GANDOLFI, I., BESTETTI, G., MARTINOTTI, M. G., FRACCHIA, L., & MARCHANT, R. **Microbial biosurfactants production, applications and future potential.** Applied Microbiology and Biotechnology, 87(2), 427-444, 2010.

BANAT, I., MAKKAR, R., & CAMEOTRA, S., **Potential commercial applications of microbial surfactants.** Applied Microbiology and Biotechnology, 53(5), 495-508, 2000.

BARROS, F. F. C., DE QUADROS, C. P., MARÓSTICA, M. R., & PASTORE, G. M. **Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos.** Química Nova, 30(2), 409, 2007.

BEZERRA, M. S. **Estudo da produção de biossurfactantes sintetizados por Pseudomonas aeruginosa AP029-GVIA**

**utilizando manipueira como fonte de carbono.** Tese de doutorado. 2012.

CHEN, H.; CHEN, Y.; JUANG, R.. **Separation of surfactin from fermentation broths by acid precipitation and two-stage dead-end ultrafiltration processes.** Journal of membrane science, v. 299, n. 1, p. 114-121, 2007.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. **Microbial production of surfactants and their commercial potential.** Microbiology and Molecular biology reviews, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

ELLEN C. S., E. C.; VESSONI-PENNA, T. C; OLIVEIRA, R. P. S **Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview,** International Biodeterioration & Biodegradation, Volume 89, Pages 88-94, ISSN 0964-8305, 2014.

FIECHTER, A. **Biosurfactants: moving towards industrial application.** Trends in Food Science & Technology, v. 3, p. 286-293, 1992.

ILORI, M. O.; AMOBI, C. J.; ODOCHA, A. C. **Factors affecting biosurfactant production by oil degrading Aeromonas**

[www.conepetro.com.br](http://www.conepetro.com.br)

br

(83) 3322.3222

contato@conepetro.com.br

**spp. isolated from a tropical environment.**  
Chemosphere, v. 61, n. 7, p. 985-992, 2005.

LIMA JUNIOR, G. A.. **Obtenção de surfactina pelo micro-organismo Bacillus subtilis ATCC 6633.** 2013.

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

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. **Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production.** AMB express, v. 1, n. 5, p. 1-19, 2011.

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

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

PACHECO, G. J., CIAPINA, E. M. P., GOMES, E. D. B., & PEREIRA JUNIOR, N. **Biosurfactant production by Rhodococcus**

**erythropolis and its application to oil removal.** Brazilian Journal of Microbiology, 41(3), 685-693, 2010.

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.

SILVA, R. D. C. F., ALMEIDA, D. G., RUFINO, R. D., LUNA, J. M., SANTOS, V. A., & SARUBBO, L. A.. **Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills.** International journal of molecular sciences, 15(7), 12523-12542, 2014.

SINGH, A., JONATHAN D. V. H., OWEN P. W.. **Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects..** Biotechnology advances 25.1: 99-121, 2007.

VELOSO, A. C. **Optimização de estratégias de alimentação para identificação de parâmetros de um modelo de E. coli. utilização do modelo em monitorização e controlo.** 2007.



**II CONEPETRO**

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

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.

WILLUMSEN, P.A.; KARLSON, U.  
**Screening of bacteria isolated from PAH-  
contaminated soils for production of  
biosurfactants and bioemulsifiers.**  
Biodegradation v. 7, p.415–423. 1997.

Yahya A. W., Sanket J., Saif A. B., Ali A. B.,  
**Biosurfactant production by Bacillus  
subtilis B30 and its application in  
enhancing oil recovery.** Colloids and  
Surfaces B: Biointerfaces, Volume 114, Pages  
324-333, ISSN 0927-7765, 2014.



**[www.conepetro.com.](http://www.conepetro.com.br)**

**br**

(83) 3322.3222

[contato@conepetro.com.br](mailto:contato@conepetro.com.br)