

Avaliação do crescimento de *Pseudomonas* sp. em permeado de soro de leite

Pedro Henrique Gomes Picoli⁽¹⁾⁽⁴⁾, Otávio Augusto Braga de Paula⁽²⁾, Marcelo Henrique Otenio⁽³⁾, Edna Froeder Arcuri⁽³⁾, Pedro Braga Arcuri⁽³⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/Fapemig), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Estagiário, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾ Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾E-mail: pedropicoli.ph@gmail.com.

Resumo — A produção de biossurfactantes a partir de resíduos agroindustriais representa uma alternativa sustentável e inovadora dentro da biotecnologia ambiental. Neste contexto, o presente trabalho avaliou o crescimento de linhagens de *Pseudomonas* sp. utilizando o permeado de soro de leite (PSL), subproduto da ultrafiltração na indústria de laticínios, como meio de cultivo microbiano. O PSL, rico em lactose e frequentemente descartado, representa risco ambiental, mas pode ser valorizado em processos biotecnológicos. Foram utilizadas 25 linhagens de *Pseudomonas* sp., cultivadas em meio contendo apenas PSL neutralizado e esterilizado. A viabilidade de crescimento foi avaliada por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no tempo zero (T0) e após 48 horas de incubação (T48). Os resultados demonstraram crescimento significativo da maioria das linhagens, considerando a taxa de crescimento, indicando que o PSL suporta o desenvolvimento microbiano e tem potencial como meio de cultivo alternativo. O estudo conclui que o PSL é um resíduo viável para aplicação biotecnológica, o próximo desafio do trabalho é avaliar a capacidade de produção de biossurfactantes com este meio de cultivo.

Termos para indexação: resíduos, laticínio, meios de cultivo, biomoléculas.

Assessment of *Pseudomonas* sp. Growth in whey permeate

Abstract — The production of biosurfactants from agro-industrial waste represents a sustainable and innovative alternative within environmental biotechnology. In this context, this study evaluated the growth of *Pseudomonas* sp. strains using whey permeate (WMP), a byproduct of ultrafiltration in the dairy industry, as a microbial culture medium. WMP, rich in lactose and frequently discarded, poses an environmental risk but can be used in biotechnological processes. Twenty-five *Pseudomonas* sp. strains were grown in a medium containing only neutralized and sterilized WMP. Growth prediction was assessed by counting colony-forming units (CFU) at time zero (T0) and after 48 hours of incubation (T48). The results demonstrated significant growth of most strains, considering the growth rate, suggesting that WMP supports microbial development and has potential as an alternative culture medium. The study concludes that PSL is a viable advantage for biotechnological application. The next challenge of the work is to evaluate the production capacity of biosurfactants with this culture medium.

Index terms: residue, dairy, culture media, biomolecules.

Introdução

Os surfactantes são compostos anfipáticos com segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos que se acumulam em interfaces entre líquidos imiscíveis, como óleo e água, promovendo a redução da tensão superficial e a estabilização de emulsões. Dentre esses compostos, destacam-se os biossurfactantes, produzidos por microrganismos a partir da biotransformação de substratos renováveis (Hee-Sik et al., 1997; Banat et al., 2010).

Entre os microrganismos produtores de biossurfactantes, destaca-se a *Pseudomonas aeruginosa*, capaz de sintetizar raminolipídeos, um tipo de glicolipídeo constituído por uma ou duas moléculas de raminose ligadas a cadeias de ácidos graxos de 8 a 12 carbonos. A produção desses compostos é influenciada por múltiplos fatores, como a composição do meio de cultura, a fonte de carbono e nitrogênio, a aeração e a agitação do sistema fermentativo, exigindo estratégias de otimização para maximizar sua produtividade (Franczy et al., 1991).

A busca por matérias-primas de baixo custo e ambientalmente sustentáveis para viabilizar economicamente a produção de biossurfactantes tem incentivado a utilização de resíduos agroindustriais como substratos fermentativos. Nesse contexto, o permeado do soro de leite (PSL), subproduto abundante e de baixo valor agregado da indústria de laticínios, surge como alternativa promissora (Cameotra; Makkar, 2004; Anjana, 2010).

Embora já tenha sido demonstrada a eficácia da *Pseudomonas aeruginosa* na produção de raminolipídeos utilizando óleo de soja residual como substrato (Lima, 2007), não foram encontrados trabalhos que aplicam o permeado de soro de leite com essa finalidade.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo investigar o crescimento de linhagens de *Pseudomonas* sp. utilizando permeado do soro do leite como principal fonte de carbono, avaliando sua viabilidade técnica e potencial de valorização dentro de um contexto de sustentabilidade e inovação na indústria de laticínios.

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo nos seguintes objetivos específicos: ODS 6 - Água limpa e saneamento: Garantir disponibilidade e manejo sustentável da água e saneamento para todos; ODS 8. Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

O permeado de soro de leite utilizado para o experimento foi coletado em laticínio da cidade de Lima Duarte, em junho de 2024. O volume de 20 litros foi neutralizado e esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Paralelamente, 25 linhagens de *Pseudomonas* sp., preservadas a -80 °C a partir do estoque de trabalho da equipe do projeto, foram recuperadas em placas de ágar BHI (brain and heart infusion).

Essas linhagens foram conduzidas para teste de crescimento, que iniciou com diluição da massa obtida da recuperação em tampão fosfato (0,5 na escala McFarland). Posteriormente, 45 µl dessa solução foram inoculados em 3 ml de PSL; a partir deste inóculo foram realizadas diluições seriadas para dois tratamentos (tempo de incubação): diluições entre a faixa de 10^{-1} e 10^{-4} sem incubação do inóculo (T0) e diluições entre 10^{-2} e 10^{-5} após 48 horas de incubação (T48), esta incubação em mesa agitadora (100 rpm) a 30 °C.

Estas diluições foram utilizadas para avaliação do crescimento por meio da técnica de contagem de microgotas (Hoben; Somasegaran, 1982). Foram pipetadas quatro gotas (10 µl cada gota) de cada diluição em quadrantes de placas de ágar BHI, que foram incubadas em estufa a 30 °C em condições de aerobiose por 24 horas. A contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) foi feita manualmente, para os dois tempos avaliados, com o auxílio de contador de colônias.

Para avaliação do crescimento do (T0) para o (T48) foi utilizada a fórmula de taxa de crescimento (Von Sperling, 2005):

$$k = \frac{1}{t} \cdot \ln\left(\frac{N(t)}{N_0}\right)$$

Onde: k = taxa específica de crescimento (ou decaimento), geralmente expressa em unidades como h⁻¹, min⁻¹, etc; t = tempo de incubação ou monitoramento; N₀ = população microbiana inicial (T0); N(t) = população no tempo determinado (T48); ln = logaritmo natural (aproximadamente 2,718).

Resultados e discussão

Os resultados obtidos de UFC/ml por linhagem para cada tratamento de tempo estão expressos em base logarítmica decimal (log₁₀) na Tabela 1, bem como a taxa de crescimento. Foram informados também espécie e gênero para as linhagens cuja identificação era conhecida.

Tabela 2. Tratamentos de descontaminação aplicados em pares de córneas e contagem bacteriana após 24h e 48h de cultivo em meio M199, incluindo pré-processamento dos globos oculares, processamento das córneas e dois antibióticos.

Nº da linhagem	Espécie	Contagem (log ₁₀) T ⁰	Contagem (log ₁₀) T ⁴⁸	Taxa de Crescimento
P86	<i>Pseudomonas sp.</i>	7,62	7,56	- 0,002878
P98	<i>Pseudomonas sp.</i>	7,44	7,69	0,011993
P116	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6,74	7,25	0,024465
P129	<i>Pseudomonas sp.</i>	7,11	7,27	0,007675
P145	<i>Pseudomonas sp.</i>	7,44	7,34	- -0,004797
P169	<i>Pseudomonas sp.</i>	7,57	7,17	- -0,019188
P175	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5,91	6,43	0,024945
P257	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5,61	7,46	0,088745
P260	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5,90	INC	NR
P263	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5,92	6,43	0,024465
P266	<i>Pseudomonas sp.</i>	NR	NR	NR
P267	<i>Pseudomonas sp.</i>	5,96	6,46	0,023985
P270	<i>Pseudomonas sp.</i>	4,60	5,53	0,044613
P273	<i>Pseudomonas sp.</i>	4,54	6,63	0,100258
P275	<i>Pseudomonas sp.</i>	5,97	7,44	0,070517
P279	<i>Pseudomonas sp.</i>	6,04	7,72	0,080590
P280	<i>Pseudomonas sp.</i>	5,38	6,04	0,031661
P282	<i>Pseudomonas sp.</i>	4,53	6,71	0,104576
P284	<i>Pseudomonas sp.</i>	4,47	6,96	0,119447
P290	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5,80	7,43	0,078192
P294	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5,79	7,69	0,091144

Continua...

Continuação.

Nº da linhagem	Espécie	Contagem (\log_{10}) T ⁰	Contagem (\log_{10}) T ⁴⁸	Taxa de Crescimento
P295	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5,32	7,43	0,101218
P302	<i>Pseudomonas sp.</i>	5,47	6,89	0,068118
P316	<i>Pseudomonas sp.</i>	5,95	6,56	0,029262
P323	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	7,17	7,64	0,022546

Legenda: INC = incontável, NR = não realizado

As 25 linhagens de *Pseudomonas sp.* foram avaliadas quanto à taxa específica de crescimento microbiano (k) após 48 horas de incubação em permeado de soro de leite, utilizado como meio de cultivo. Dentre essas, 21 apresentaram valores positivos de k, indicando aumento populacional ao longo do tempo, o que demonstra que o permeado foi eficiente como substrato para o desenvolvimento da maioria dos isolados.

Linhagens como P284, P282, P295 e P294 apresentaram as maiores taxas específicas de crescimento, sugerindo elevada adaptabilidade ao meio e potencial biotecnológico para aplicações futuras, como produção de biossurfactantes. Por outro lado, algumas linhagens, como P86, P145, P169 e P175, apresentaram valores negativos de k, refletindo uma redução na densidade celular, possivelmente associada à baixa adaptação, limitação nutricional ou condições inibitórias específicas do meio. Duas linhagens (P260, P266) não permitiram o cálculo do parâmetro por ausência ou nulidade de dados.

A viabilidade do uso do permeado como meio de cultivo microbiológico já foi demonstrada em outros estudos, como no trabalho de Hassemer (2016), que evidenciou o crescimento significativo de *Bacillus megaterium* utilizando esse subproduto como fonte de carbono. Os resultados apresentados mostram que o permeado de soro de leite pode ser uma alternativa viável para o cultivo de linhagens de *Pseudomonas sp.*, favorecendo o crescimento de diversas linhagens, com destaque para aquelas com maior performance metabólica, que podem ser exploradas em aplicações como produção de biossurfactantes ou biodegradação.

Conclusões

Os resultados demonstram a viabilidade do permeado de soro de leite como meio de cultivo para crescimento de *Pseudomonas sp.*, evidenciando seu potencial para aplicações em processos biotecnológicos, além de contribuir para o reaproveitamento de um resíduo agroindustrial de baixo valor agregado. Conclui-se, portanto, que o permeado de soro de leite é um resíduo viável para aplicação biotecnológica.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil, pela concessão de bolsa. À Embrapa Gado de Leite pela oportunidade de treinamento, o que nos proporcionou obter experiência e aprendizado; à equipe do projeto e ao mestrando Otávio pelo acompanhamento, orientação e apoio durante o período de estudos e treinamento.

Ao financiamento do projeto: FAPEMIG APQ-02254-23: Produção de biossurfactante por *Pseudomonas spp* em permeado de soro de leite; e pela Bolsa de Iniciação Científica (BIC)

da Fapemig dentro do mesmo projeto.

Referências

- ANJANA, J. D. Production of biosurfactants. In: KOSARIC, N.; SUKAN, F. V. (ed.). **Biosurfactants**: production, properties, applications. New York: Marcel Dekker, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1201/9780585355702>.
- BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTELLI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 429-440, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2589-0>.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 266-273, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.04.006>.
- FRANCY, R. J.; THOMAS, J. M.; RAYMOND, R. L.; WARD, C. H. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 237-246, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01576061>.
- HASSEMER, G. de S. **Produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* utilizando permeado de soro de leite. 2016.** 108 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.
- HEE-SIK, K.; BYUNG-DAE, Y.; CHANG-HO, L.; HYUN-HYO, S.; HEE-MOCK, O.; TOHORU, K.; YOSHIKI, T. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 1, p. 41-46, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)82784-5](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)82784-5).
- HOBEN, H. J.; SOMASEGARAN, P. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1246-1247, 1982. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.44.5.1246-1247.1982>.
- LIMA, C. J. B. de. **Produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual.** 2007. 168 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.
- NAÇÕES UNIDAS. **Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 8**: Trabalho decente e crescimento econômico. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/8>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- VON SPERLING, M. V. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** 4. ed. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.