

Tabela 2 : Emulsificação de gasolina, querosene e Árabe Leve, por B-AM, B-AR e B-SML, com 7 e 15 dias de crescimento.

Bactérias	Substâncias	E <sub>24</sub> (%)		A (%)		B (%)		CB (µg C. cm <sup>-3</sup> )		
		7	15	7	15	7	15	0	7	15
B-AM	Gasolina	22,23	18,60	57,17	19,80	ND	21,70	0,832	0,049	0,048
	Querosene	33,46	61,30	56,69	100,00	ND	ND			
	Árabe Leve	42,73	24,80	21,37	ND	29,17	31,10			
B-AR	Gasolina	4,20	59,40	5,60	100,00	3,00	23,80	1,509	0,087	0,097
	Querosene	43,00	61,00	71,83	100,00	ND	ND			
	Árabe Leve	33,81	27,30	21,21	34,80	24,24	34,78			
B-SML	Gasolina	42,19	47,50	97,90	93,50	ND	15,90	0,721	0,094	0,071
	Querosene	40,96	50,90	69,42	80,60	ND	ND			
	Árabe Leve	32,00	21,80	15,80	ND	27,09	105,90			

E<sub>24</sub>: taxa de emulsificação com 24 horas de repouso; A: emulsificação na fase não aquosa; B: emulsificação na fase aquosa; CB: carbono bacteriano; ND: não detectado.

#### 4. Apoio Financeiro

CAPES, CNPq (VLT).

#### 5. Referências

- BANAT, I., MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S. Potencial application of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BICCA, F. C., FLECK, L. C., AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Rev. Microbiol.* v. 30, p. 231-236, 1999.
- CARLUCCI, A. F., CRAVEN, D. B., ROBERTSON, D. J., WILLIAMS, P. M. Surface-film microbial populations diel amino acid metabolism, carbon utilization and growth rates. *Mar. Biol.*, v. 92, p. 289-297, 1986.
- CASSIDY, d. p., HUDAK, A. J. Microorganism selection and biosurfactant production in a continuously and periodically operated bislurry reactor. *J. Hazardous Mat.* v. B84, p. 253-264, 2001.
- DAVIS, D. A., LYNCH, H.C., VARLEY, J. The production of surfactant in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the condition of nitrogen metabolism. *Enz. Microb. Technol.* v.25, p. 322-329, 1999.
- DESAI, J.D., BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potencial. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 61, p. 47-64, 1997.
- HEALY, M. G., DEVINE, C. M., MURPHY, R. Microbial production of biosurfactants. *Res. Conserv. Recyc.*, v. 18, p. 41-57, 1996.
- KEPNER JR., R., PRATT, J. R. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microb. Rev.*, v. 58, p. 603-615, 1994.
- MEYER-REIL, L. A.. Microbial life in sedimentary biofilms – the challenge to microbial ecologists. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* v. 112, P. 303-311, 1994.
- PARASZKIEWICZ, K., KANWAL, A., DLUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *J. Biotechnol.* v. 92, p. 287-294, 2002.
- RAHMAN, K.S.M., BANAT, I.M., THAHIRA, J., Tha. Thayaumanavan, Lakshmanapermalsamy, P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresource Technology*, v.81, p.25-32, 2002.

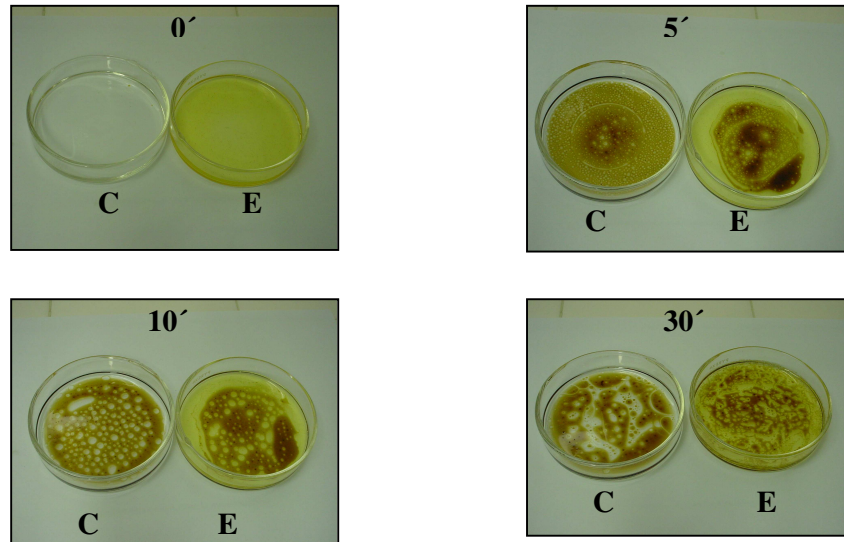


Figura 2. Colapso da gota de óleo por B-SML, com 7 dias de incubação, no controle e experimento.

A adição de 1 ml de Árape Leve aos 9 ml de cultura bacteriana formou apenas uma delgada camada de emulsão, dificultando a determinação de outros parâmetros, como emulsificação na fase não aquosa (A) e aquosa (B). Para verificar a relação inversa entre taxa de emulsificação/biomassa bacteriana e a quantificação dos parâmetros A e B, foram preparados meios de cultura líquido com biomassa de 0,832, 1,509 e 0,721  $\mu\text{g C. cm}^{-3}$  para B-AM, B-AR e B-SML, respectivamente. Após 7 dias de incubação, as maiores taxas de emulsificação foram para gasolina (B-AM) e Árape Leve (B-AM, B-AR e B-SML), com biomassa de 0,049, 0,087 e 0,094  $\mu\text{g C. cm}^{-3}$ , respectivamente. O parâmetro A seguiu a tendência da taxa de emulsificação, exceto para gasolina (B-SML), com 97,90% de emulsificação na fase não aquosa (Tab. 2).

Com 15 dias de incubação, a taxa de emulsificação para querosene variou entre 50,90-61,30%, em todas as bactérias. As menores taxas foram verificadas para a gasolina e o Árape Leve. B-AM tinha apenas 0,048  $\mu\text{g C. cm}^{-3}$  no décimo-quinto dia e taxas de emulsificação bem menores que as outras (Tab. 2).

A emulsificação na fase não aquosa (A) atingiu maiores taxas com 15 dias de incubação, atingindo valores de 100,00% para gasolina (B-AM e B-AR) e querosene (B-AR). A emulsificação na fase aquosa (B) não foi observada para o querosene. Os maiores valores foram encontrados para o Árape Leve, 105,90% (B-SML) (Tab. 2).

*Pseudomonas fluorescens*, bactéria em forma de bastonete e usando óleo de oliva nas proporções 1:1 e 1:3, como fonte de carbono, apresentou taxa de emulsificação de 1,67 e 6,15%, respectivamente (Healy *et al.*, 1996). Estudando-se a produção de biosurfactantes, com óleo diesel como fonte de carbono, bactérias Gram-negativas apresentaram taxa de emulsificação máxima de 12,00% (Cassidy e Hudak, 2001). Cepas de *Rhodococcus*, isoladas de sítios contaminados com óleo diesel, apresentou emulsificação entre 10,00-60,00%, utilizando como fontes de carbono extrato de levedura, glicose e lactose (Bicca *et al.*, 1999). As taxas de emulsificação de B-AM, B-AR e B-SML ficaram próximas a esses valores, exceto para B-AR (gasolina).

Durante os quinze dias de experimento, a biomassa continuou com a tendência de queda para todas as bactérias, chegando a menos de 10,00% da existente no início do experimento. Na literatura, a produção de biosurfactantes só é observada quando o crescimento bacteriano se encontra em fase estacionária, sem contudo haver diminuição de biomassa (Davis *et al.*, 1999; Rahman, *et al.*, 2002). As cepas B-AM, B-AR e B-SML somente aumentaram as taxas de emulsificação de gasolina, querosene e Árape Leve, com biomassa bem menor que a encontrada na literatura.

A utilização de três substratos marinhos para seleção das bactérias produzindo surfactantes, evidenciaram diferentes graus de eficiência para as taxas de emulsificação, com especificidade distinta para os componentes do petróleo. A bacto-peptona, utilizada como fonte de carbono para o crescimento bacteriano, é também satisfatória para a manutenção, em laboratório, da produção de surfactante.

realizados. Triplicatas de 4 ml das três culturas receberam 6 ml de três substâncias hidrofóbicas: gasolina, querosene e Árabe Leve. A mistura foi feita durante 2 minutos em vortex, com repouso de 24 horas (Paraszkiewicz et al., 2002).

A taxa de emulsificação ( $E_{24}$ ) foi determinada pela porcentagem da altura da camada de emulsão (mm), dividida pela altura total da coluna líquida (mm). O parâmetro A foi definido como a emulsificação da substância hidrofóbica na fase não aquosa e o B, na fase aquosa. O A foi determinado pela porcentagem da altura da substância hidrofóbica emulsificada (mm) na fase não aquosa pela altura total desta fase (mm). O B foi determinado pela altura da substância hidrofóbica emulsificada (mm) na fase aquosa pela altura total desta fase (mm) (Paraszkiewicz et al., 2002).

## 2.5. Quantificação da biomassa de bactérias

Foi utilizado um microscópio de epifluorescência (Zeiss, mod. Axiosp 1) e concentração bacteriana de  $10^7$  células (Kepner e Pratt, 1994) para a quantificação da biomassa bacteriana ( $\mu\text{g C. cm}^{-3}$ ) com o cromóforo laranja de acridina (Carlucci, *et al.*, 1986).

## 3. Resultados e Discussão

Foram selecionadas para os experimentos, apenas as colônias de bactérias com pigmentação amarelo-alaranjada, com bom crescimento em meio líquido (Fig. 1). As bactérias B-AM, B-AR e B-SML, após bioamplificação em meio líquido, se caracterizaram pela morfologia de bastonetes finos e aeróbios. O isolamento destas bactérias com forma similar, a partir de substratos diferentes e produzindo pigmentos de mesma cor, indica que a microbiota marinha expressa sua diversidade nos processos metabólicos, interagindo com o ambiente, e modificando-o, mas podendo sintetizar produtos similares (Meyer-Reil, 1994).



Figura 1. Culturas de B-AM, B-AR e B-SML produzindo pigmento amarelo alaranjado, da esquerda para a direita; o primeiro contém apenas meio de cultura estéril.

A etapa preliminar de verificação da presença/ausência de bioemulsificante foi realizada pelo teste do colapso da gota de óleo observada em 5 minutos, após a adição de Árabe Leve, em B-AM, B-AR e B-SML. O óleo apresentou emulsificação final em 30 minutos, quando ele formou uma rede de gotículas (Fig. 2).

Na segunda etapa, a taxa de emulsificação foi quantificada. B-AR teve a maior taxa (8,80%) com 39 dias de incubação, seguida por B-SML (8,00%) com 25 dias. B-AM não mostrou variação na taxa de emulsificação, como também teve os menores valores. A biomassa bacteriana apresentou decaimento, ao final do período de incubação. B-AR, apresentou sensível diminuição de biomassa bacteriana aos 39 dias, como também B-SML, aos 25 dias (Tab. 1).

Tabela 1: Emulsificação de Árabe Leve por B-AM, B-AR e B-SML, com 11, 25, 32 e 39 dias de incubação em meio de cultura líquido.

Bactérias	Substância	$E_{24}$ (%)				CB ( $\mu\text{g C. cm}^{-3}$ )			
		11	25	32	39	11	25	32	39
B-AM		4,20	4,40	6,00	4,60	0,002	0,007	0,016	0,006
B-AR	Árabe Leve	6,50	5,50	6,30	8,80	0,271	0,077	0,015	0,080
B-SML		4,20	8,00	7,70	5,40	0,290	0,066	0,098	0,090

$E_{24}$ : taxa de emulsificação com 24 horas de repouso; CB: carbono bacteriano.

## 1. Introdução

Microrganismos devido a relação superfície/volume e a diversidade metabólica são candidatos promissores à produção de surfactantes. Eles podem ser produzidos por bactérias, leveduras, fungos e, particularmente por bactérias em ambientes com derrames de óleo, que passam a utilizá-lo como substrato de crescimento. Evolutivamente, bactérias se adaptaram para sintetizarem produtos ativos de superfície, capacitando-as para a absorção, emulsificação, dispersão ou solubilização de substâncias não miscíveis em água (Healy, et al., 1996). A busca de cepas bacterianas produtoras de surfactantes visa o emprego potencial destas substâncias em alimentos e indústrias têxteis, restauração ambiental e recuperação de óleos em poços de petróleo, solo e sedimento.

Os biosurfactantes são produzidos, majoritariamente por bactérias aeróbias em meio de cultura líquida e possuem atividade intra- ou extracelular. Fisiologicamente, os emulsificantes são secretados extracelularmente durante o crescimento da microflora e têm a finalidade de transportar ou translocar substratos insolúveis através da membrana. A disponibilidade destas substâncias intracelularmente aumentaria a diversidade de fontes de carbono e de energia para as bactérias. Assim, as comunidades bacterianas capazes de emulsificar, dispersar e solubilizar substratos, terão maiores vantagens sobre as outras que utilizam componentes lábeis da matéria orgânica. A utilização de substâncias hidrofóbicas auxilia a detoxificação ambiental, inclusive os metais (Banat, *et al.*, 2000).

Devido as propriedades físico-químicas, os biosurfactantes são melhores que os sintéticos para aplicação na indústria de petróleo. Os sintéticos, disponíveis no mercado, podem levar à depleção da vida, trazendo perdas na biodiversidade e características físico-químicas ambientais.

Embora as bactérias hidrocarbonoclasticas sintetizem a maioria dos biosurfactantes, a literatura também relata que esses agentes também são produzidos a partir de compostos hidrofílicos, como glicose e etanol, glicose e lactose (Desai e Banat, 1997; Bicca *et al.*, 1999).

A diversidade de substratos que abrigam comunidades bacterianas, bem como a busca de fontes de carbono economicamente viáveis para a produção de biosurfactantes, são áreas ainda a serem exploradas. O objetivo deste trabalho é verificar a produção de biosurfactantes por bactérias coletadas de três diferentes substratos na Praia da Boa Viagem, Baía de Guanabara – RJ, utilizando a bactopectona como fonte de carbono e de energia.

## 2. Material e método

### 2.1. Coleta do material biológico

Foram coletadas amostras de água do mar, sedimento superficial (2cm) de mesolitoral, e a alga *Grateloupia sp.*, na Praia da Boa Viagem, Niterói-RJ (22°50'47"S and 43°05'28"W).

### 2.2. Extração das bactérias dos substratos e crescimento em meio sólido

As amostras de sedimento e de alga foram diluídas 1:5 em frascos de 50 ml e submetidas ao tratamento de ultrassom por 5 minutos (Branson® 3210), a fim de se proceder à desagregação do biofilme bacteriano. As amostras de água não foram submetidas a esse tratamento.

Após o tratamento, alíquotas de 1 ml foram retiradas das três amostras e semeadas em placas de Petri (ágar-ágar 20g/l e bactopectona 1%). A incubação durou 36 horas.

### 2.3. Bioamplificação e manutenção em meio de cultura líquido

Foram selecionadas as colônias bacterianas pigmentadas, que apresentaram um bom crescimento em meio sólido. As colônias de bactérias originadas das amostras da água do mar, da alga *Grateloupia sp* e do sedimento de mesolitoral foram denominadas B-AM, B-AR e B-SML, respectivamente, e foram semeadas em 10 ml de meio líquido, contendo água do mar 75% (esterilização a 1 atm, 20 minutos) e bactopectona 1%. Este meio de cultura também foi usado para manutenção do crescimento bacteriano e para os experimentos.

### 2.4. Emulsificação

O colapso da gota de óleo foi realizado em placa de Petri com 30 ml de meio de cultura contendo bactérias com 7 dias de incubação, em triplicata. O controle continha apenas 30 ml de meio de cultura esterilizado. Foram adicionadas 2 gotas de Ára-be Leve nas placas de Petri e fotografadas nos tempos 0, 5 e 30 minutos.

A taxa de emulsificação foi realizada nas culturas B-AM, B-AR e B-SML, com 11, 25, 32 e 39 dias de incubação. Para cada 9 ml das culturas, foi adicionado 1 ml de Ára-be Leve, misturados durante 2 minutos em vortex e deixados 24 horas em repouso. Após esse período, a altura de Ára-be Leve emulsificado (mm) foi comparada à altura total adicionada (mm).

Para se determinar outros parâmetros da emulsificação, culturas de 36 horas de B-AM, B-AR e B-SML foram semeadas em meio líquido e incubadas. Com 7 e 15 dias de crescimento bacteriano, os testes de emulsificação foram



# 2º CONGRESSO BRASILEIRO DE P&D EM PETRÓLEO & GÁS

## PRODUÇÃO DE SURFACTANTE POR BACTÉRIAS COLETADAS EM TRÊS SUBSTRATOS MARINHOS.

Frederico Sobrinho da Silva, Mirian A. C. Crapez\*, Maria das Graças S. Bispo, Natascha Krepsky, Luiz F. Fontana, Alessandro L. Pimenta, Fernanda Savergnini, Marcelo A. Vasconcelos, Valéria L. Teixeira.

Universidade Federal Fluminense, Programa de Pós Graduação em Biologia Marinha. Cx. P.100.644. Niterói, RJ. CEP: 24001-970. \*E-mail: [mirian@vm.uff.br](mailto:mirian@vm.uff.br)

### Resumo

Microrganismos devido a relação superfície/volume e a diversidade metabólica são candidatos promissores à produção de surfactantes. Biosurfactantes são substâncias químicas produzidas por microrganismos. Eles podem ser produzidos por bactérias, leveduras, fungos e, particularmente por bactérias em ambientes com derrames de óleo, que passam a utilizá-lo como substrato de crescimento. Três cepas foram isoladas da coluna d'água (B-AM), da alga *Grateloupia sp* (B-AR) e do sedimento do mesolitoral (B-SML) da praia de Boa Viagem, RJ. As bactérias se caracterizaram por serem bastonetes aeróbios, produzindo pigmento amarelo-alaranjado. Com Árabe Leve, o colapso da gota de óleo foi observado desde os cinco minutos iniciais do experimento. Foram realizados testes para determinação das taxas de emulsificação ( $E_{24}$ ), emulsificação na fase não aquosa (A) e aquosa (B), utilizando-se gasolina, querosene e Árabe Leve. As maiores taxas foram observadas com quinze dias de incubação, ocorrendo, simultaneamente, decréscimo da biomassa bacteriana.

Palavras-Chave: surfactante, bactéria, taxa de emulsificação, Baía de Guanabara.

### Abstract

Micro-organisms, because of their large surface-to-volume ratio and diverse synthetic capabilities are promising candidates for widening the present range of surfactants. Biosurfactants are those chemicals which are produced by micro-organisms. They are produced by bacteria, yeasts and fungi, and particularly by bacteria which are in a state of growth on water-immiscible substrate which is a source of food for example crude oil spillage treated with selected micro-organisms. Three strains were isolated from water column (B-AM), the algae *Grateloupia sp*. (B-AR), and mid coast sediment (B-SML) of Boa Viagem beach, RJ. The aerobic rods isolated produced yellow-orange pigments. The presence of biosurfactants was analysed by the oil drop collapse test. Emulsification index ( $E_{24}$ ), emulsification index at non-aqueous phase (A) and aqueous phase (B), were assayed with gasoline, kerosene and Arabian light. The highest index was observed within fifteen days of incubation, when biomass were lower.

Keywords: surfactant, bacteria, emulsification index, Baía de Guanabara.